

***Protección frente a estreses abióticos  
extremos mediante la sobreexpresión ectópica  
combinada de HaHSFA9 y HaHSFA4a***

**José María Personat Gálvez**

Departamento de Biotecnología Vegetal,  
Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNASE)  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)  
Sevilla, Abril de 2014

**TESIS DOCTORAL**



**Protección frente a estreses abióticos extremos  
mediante la sobreexpresión ectópica combinada de  
*HaHSFA9* y *HaHSFA4a***

TESIS DOCTORAL

Memoria presentada por **José María Personat Gálvez**  
para optar al título de Doctor en Biotecnología.

Abril de 2014.





# **Protección frente a estreses abióticos extremos mediante la sobreexpresión ectópica combinada de *HaHSFA9* y *HaHSFA4a***

Visado en Sevilla, a ..... de ..... de 2014.

Los Directores:

Dr. Juan Jordano Fraga

Dra. Concepción Almoguera Antolínez

Profesor de Investigación del CSIC

Científica Titular del CSIC

El Tutor:

Dr. Francisco Javier Cejudo Fernández

Catedrático de la Universidad de Sevilla



***El presente trabajo se ha realizado en el marco del proyecto BIO2008-00634 del Plan Nacional de I+D+i, dentro del Programa Nacional de Formación de Personal Investigador.***



DOCTOR D. D. JOSÉ MANUEL PARDO PRIETO, DIRECTOR DEL INSTITUTO DE RECURSOS NATURALES Y AGROBIOLOGÍA DE SEVILLA DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Certifica: Que la presente Memoria de Investigación titulada “Protección frente a estreses abióticos extremos mediante la sobreexpresión ectópica combinada de *HaHSFA9* y *HaHSFA4a*”, presentada por D. José María Personat Gálvez para optar al grado de Doctor en Biotecnología, ha sido realizada en el Departamento de Biotecnología Vegetal, bajo la dirección de los Drs. D. Juan Jordano Fraga y Dña. Concepción Almoguera Antolínez, reuniendo todas las condiciones exigidas a los trabajos de Tesis Doctorales.

En Sevilla, a ..... de ..... de 2014



*A mi Manolo*





# Índice



<b>Índice</b>	<b>3</b>
<b>Introducción</b>	<b>11</b>
1. Biología molecular de la respuesta a choque térmico.....	13
2. Proteínas de Choque Térmico de bajo peso molecular.....	15
<i>Clasificación de las sHSP de plantas</i> .....	15
<i>Estructura de las sHSP</i> .....	16
<i>Funciones de las sHSP</i> .....	18
3. Factores de transcripción de Choque térmico en plantas.....	20
<i>Estructura de los HSF</i> .....	20
<i>Diversidad funcional de los HSF de plantas</i> .....	22
4. El factor HSFA9, un HSF esencial para la expresión de HSP durante el desarrollo embrionario en plantas.....	24
<i>El factor HaHSFA9 induce la acumulación de proteínas HSP y aumenta la longevidad en semillas</i> .....	25
<i>Interacción funcional entre los factores HaHSFA9 y HaHSFA4a</i> .....	27
<i>La sobreexpresión ectópica del factor HaHSFA9 confiere tolerancia a deshidratación severa</i> .....	30
5. El aparato fotosintético en plantas.....	33
<i>Estructura y composición del Fotosistema I</i> .....	34
<i>Estructura y composición del Fotosistema II</i> .....	36
<i>La cadena de transporte de electrones</i> .....	38

6. El estrés oxidativo y el daño del aparato fotosintético.....	40
7. La senescencia en plantas.....	42

## Objetivos 45

## Materiales y métodos 49

1. Material biológico.....	51
1.1. Plantas transgénicas de tabaco.....	51
1.1.1. Plántulas transgénicas.....	51
1.1.2. Semillas transgénicas.....	52
1.1.3. Cultivo <i>in vitro</i> .....	53
1.1.4. Cultivo en tierra.....	54
1.2. Bacterias.....	55
1.2.1. <i>Escherichia coli</i> .....	55
1.2.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	55
2. Análisis y tratamientos de ADN.....	55
2.1. Purificación de ADN plasmídico.....	55
2.2. Cuantificación de ADN.....	56
2.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	56
2.4. Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa.....	56
2.5. Reacciones enzimáticas de ADN.....	56

2.5.1. Digestión de ADN con enzimas de restricción.....	56
2.5.2. Ligación de fragmentos de ADN.....	57
2.5.3. Reacción de secuenciación.....	57
3. Transformación de bacterias.....	57
3.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i> .....	57
3.2. Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	58
4. Obtención de plantas transgénicas de tabaco.....	59
4.1. Construcción del vector binario 35S:A4a.....	59
4.2. Transformación de discos de hoja de tabaco.....	60
4.3. Selección de transformantes y enraizamiento.....	61
4.4. Obtención de plantas transgénicas homocigóticas.....	61
5. Análisis y tratamientos de ARN.....	62
5.1. Extracción de ARN vegetal.....	62
5.2. Cuantificación de ARN.....	62
5.3. Electroforesis desnaturalizante de ARN.....	62
5.4. Purificación de ARN.....	63
5.5. Síntesis de ADNc.....	63
6. Obtención de la genoteca por hibridación sustractiva.....	63
6.1. Hibridación sustractiva.....	64
6.2. Clonación y análisis de la genoteca.....	66

7. Análisis transcripcional por RT-qPCR.....	66
7.1. Diseño de los oligonucleótidos.....	67
7.2. Condiciones de la reacción de RT-qPCR.....	67
8. Extracción y análisis de Proteínas.....	69
8.1. Extracción de proteínas.....	69
8.1.1. Extracción de proteínas con tampón Laemmli.....	69
8.1.2. Extracción de proteínas con tampón fenol.....	70
8.2. Aislamiento de membranas tilacoidales.....	70
8.3. Cuantificación de proteínas.....	71
8.3.1. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	71
8.3.2. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.....	71
8.4. Electroforesis de proteínas.....	71
8.4.1. Electroforesis SDS-PAGE.....	71
8.4.2. Electroforesis 2D-PAGE.....	72
8.4.3. Electroforesis en geles <i>Blue Native</i> .....	73
8.5. Tinción de proteínas con azul coloidal de Coomassie.....	74
8.6. Detección de proteínas por <i>western blot</i> .....	74
8.6.1. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF.....	75
8.6.2. Inmunodetección.....	75
8.7. Cuantificación de señales de <i>western blot</i> .....	76

8.8. Solubilización de proteínas de las membranas tilacoidales.....	76
9. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos.....	77
10. Fluorescencia de la clorofila.....	78
11. Tratamientos de estrés abiótico.....	78
11.1. Tratamientos de deshidratación severa DT2.....	79
11.2. Tratamientos de estrés oxidativo con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	80
11.3. Tratamientos de inducción de la senescencia vegetativa.....	80
11.3.1. Inducción de la senescencia en la oscuridad.....	80
11.3.2. Inducción de la senescencia por falta de nutrientes a la luz.....	81
11.4. Tratamiento de aclimatación al calor.....	81
11.5. Ensayos de termotolerancia.....	82
12. Cuantificación de la pérdida de electrolitos.....	82
13. Análisis estadístico.....	82
<b>Resultados</b>	<b>85</b>
<b>A. Protección del aparato fotosintético mediada por el programa genético     activado por el factor <i>HaHSFA9</i>.....</b>	<b>87</b>
1. Acumulación reducida de sHSP-CI en las raíces de las plántulas 35S:A9.....	87
2. El programa genético activado por el factor <i>HaHSFA9</i> incluye la expresión de genes <i>shsp-P</i> .....	88
2.1. Acumulación de proteínas sHSP-P inducida por el factor <i>HaHSFA9</i> .....	89
2.2. Asociación de las proteínas sHSP-P a las membranas tilacoidales en las plántulas 35S:A9 en condiciones normales de cultivo.....	91

3. El programa genético activado por el factor <i>HaHSFA9</i> mejora la estabilidad de las membranas celulares en las plántulas 35S:A9.....	94
4. Efectos positivos del programa genético activado por el factor <i>HaHSFA9</i> sobre la maquinaria fotosintética de las plántulas 35S:A9 en condiciones normales de cultivo.....	94
5. El programa genético activado por el factor <i>HaHSFA9</i> protege al aparato fotosintético frente a deshidratación severa en las plántulas 35S:A9.....	97
6. El programa genético activado por el factor <i>HaHSFA9</i> protege al aparato fotosintético frente a estrés oxidativo severo.....	100
7. La aclimatación al calor no confiere resistencia a estrés oxidativo extremo a las plántulas no transgénicas.....	104
8. La sobreexpresión ectópica del factor <i>HaHSFA9</i> retarda la senescencia vegetativa en las plántulas 35S:A9.....	106
<b>B. Estudio de la interacción funcional entre los factores <i>HaHSFA9</i> y <i>HaHSFA4a</i> en plantas transgénicas de tabaco.....</b>	<b>110</b>
1. La sobreexpresión ectópica del factor <i>HaHSFA4a</i> en plántulas de tabaco no confiere ninguno de los fenotipos descritos para la sobreexpresión ectópica de <i>HaHSFA9</i> .....	110
1.1. La sobreexpresión ectópica del factor <i>HaHSFA4a</i> no induce la acumulación de proteínas HSP en las plántulas 35S:A4a a temperaturas normales de crecimiento.....	111
1.2. La sobreexpresión ectópica del factor <i>HaHSFA4a</i> no confiere termotolerancia en las plántulas 35S:A4a.....	112
1.3. La sobreexpresión ectópica del factor <i>HaHSFA4a</i> no confiere tolerancia a condiciones extremas de deshidratación ni de estrés oxidativo en las plántulas 35S:A4a.....	114
2. La sobreexpresión ectópica conjunta de los factores <i>HaHSFA9</i> y <i>HaHSFA4a</i> en plántulas de tabaco mejora los fenotipos previamente descritos para la sobreexpresión de <i>HaHSFA9</i> .....	115



2.1. La sobreexpresión ectópica conjunta de <i>HaHSFA4a</i> y <i>HaHSFA9</i> aumenta la acumulación de determinadas isoformas HSP a temperaturas normales de crecimiento en las plántulas 35S:A9/A4a.....	117
2.2. La sobreexpresión ectópica conjunta de <i>HaHSFA4a</i> y <i>HaHSFA9</i> mejora la estabilidad de las membranas celulares en las plántulas 35S:A9/A4a.....	121
2.3. La sobreexpresión ectópica conjunta de <i>HaHSFA4a</i> y <i>HaHSFA9</i> en las plántulas 35S:A9/A4a no tiene efectos adicionales sobre la maquinaria fotosintética en condiciones normales de cultivo.....	122
2.4. La sobreexpresión ectópica conjunta de <i>HaHSFA4a</i> y <i>HaHSFA9</i> mejora la tolerancia frente a deshidratación severa en las plántulas 35S:A9/A4a.....	124
2.5. La sobreexpresión ectópica conjunta de <i>HaHSFA4a</i> y <i>HaHSFA9</i> mejora la tolerancia a estrés oxidativo severo en las plántulas 35S:A9/A4a.....	124
2.6. La sobreexpresión ectópica conjunta de <i>HaHSFA4a</i> y <i>HaHSFA9</i> mejora la tolerancia a tratamientos que inducen la senescencia vegetativa en las plántulas 35S:A9/A4a.....	126
<b>C. Identificación de otros genes activados por el factor <i>HaHSFA9</i>.....</b>	<b>130</b>
1. Obtención de la genoteca por hibridación sustractiva.....	130
2. Análisis y selección de clones.....	130
3. Comprobación de la inducción de los genes candidatos en las plántulas 35S:A9.....	132
<b>Discusión</b>	<b>137</b>
<i>El programa genético activado por HSFA9 incluye proteínas sHSP-P.....</i>	<i>140</i>
<i>El programa genético activado por HaHSFA9 protege la maquinaria fotosintética y confiere tolerancia a las plántulas 35S:A9 frente al daño producido por condiciones drásticas de deshidratación o estrés oxidativo.....</i>	<i>143</i>
<i>El programa genético activado por HaHSFA9 retarda la senescencia vegetativa en las plántulas 35S:A9.....</i>	<i>145</i>

<i>El programa genético activado por HaHSFA9 incluye la expresión de otros genes distintos a los genes hsp.....</i>	145
<i>El factor HaHSFA4a co-activa junto a HaHSFA9 el programa genético implicado en la tolerancia a estreses abióticos extremos.....</i>	150
<b>Conclusiones</b>	<b>155</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>159</b>
<b>Anexo I.</b> Clasificación de los genes posiblemente inducidos en las plántulas 35S:A9.	<b>185</b>
<b>Anexo II.</b> Publicaciones derivadas del trabajo de esta Tesis.	<b>201</b>
<p><b>Almoguera C., Prieto-Dapena P., <u>Personat J.M.</u>, Tejedor-Cano J., Lindahl M., Diaz-Espejo A. and Jordano J. (2012) Protection of the photosynthetic apparatus from extreme dehydration and oxidative stress in seedlings of transgenic tobacco. <i>PLoS One</i>, <b>7</b>, e51443.</b></p> <p><b>Tejedor-Cano J., Carranco R., <u>Personat J.M.</u>, Prieto-Dapena P., Almoguera C., Espinosa J.M. and Jordano J. (2014) A passive repression mechanism that hinders synergic transcriptional activation by heat shock factors involved in sunflower seed longevity. <i>Molecular Plant</i>, <b>7</b>, 256-259.</b></p> <p><b><u>Personat J.M.</u>, Tejedor-Cano J., Prieto-Dapena P., Almoguera C. and Jordano J. (2014) Co-overexpression of two Heat Shock Factors results in enhanced seed longevity and in synergistic effects on seedling tolerance to severe dehydration and oxidative stress. <i>BMC Plant Biology</i>, <b>14</b>, 56.</b></p>	

# Introducción

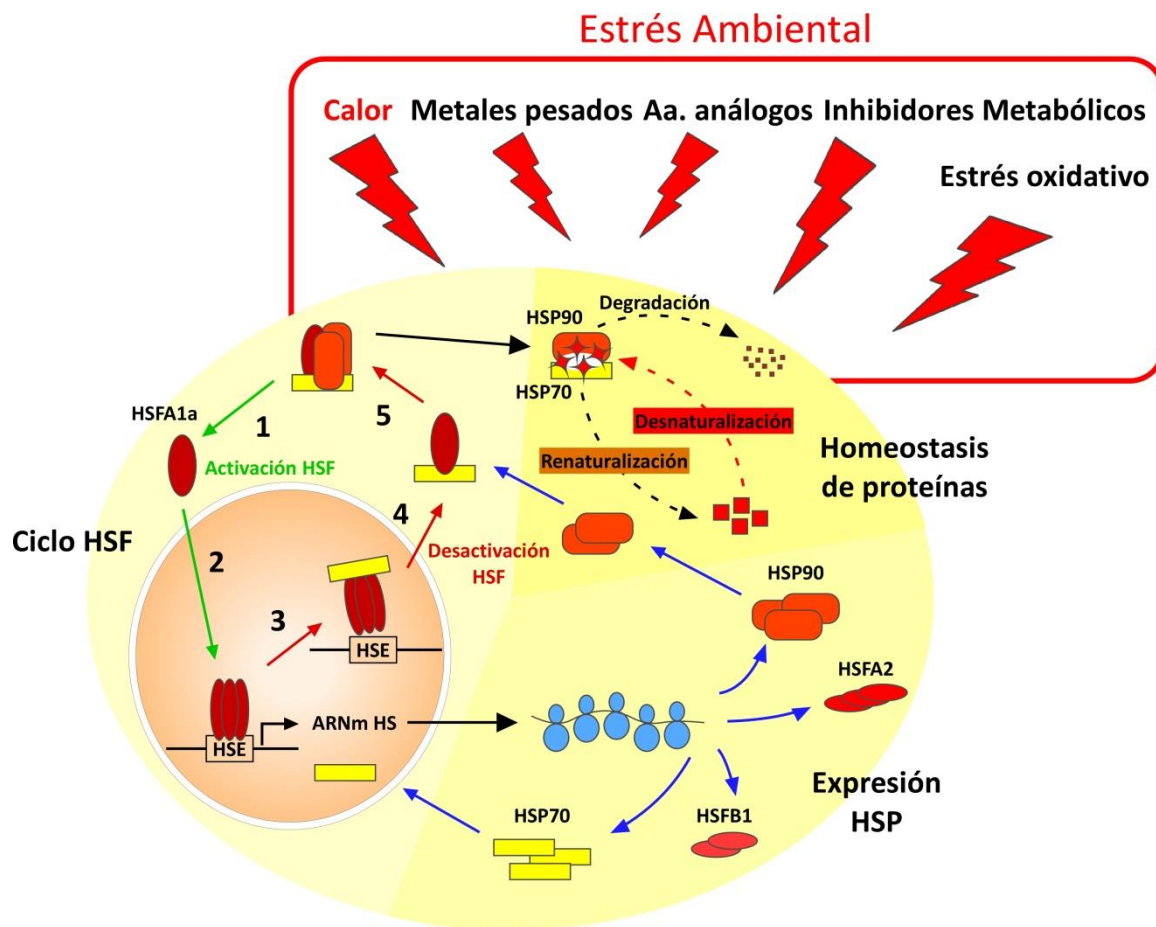


## 1. Biología molecular de la respuesta a choque térmico.

Como organismos sésiles, las plantas se han especializado en el crecimiento y propagación bajo distintas condiciones de estrés, como bajas o altas temperaturas, estrés por alta salinidad, alta concentración de metales pesados, o estrés por deficiencia de agua. Para la supervivencia de la planta bajo estas condiciones, se requiere de una red interconectada de sistemas de respuestas a estrés. La respuesta a choque térmico es un mecanismo de defensa celular presente en todos los organismos, altamente conservado y que se activa por una gran variedad de estímulos citotóxicos como elevadas temperaturas u otros estreses abióticos. Esta respuesta se caracteriza por una rápida reprogramación de la expresión genética, dirigida a la acumulación transitoria de proteínas de choque térmico (HSP, *Heat Shock Proteins*), la mayoría de las cuales actúan como chaperonas moleculares, protegiendo frente al daño producido por el estrés (Nover, 1991; Cherry, 1994; Baniwal *et al.*, 2004; Scharf *et al.*, 2012).

En los últimos 50 años, las investigaciones en este campo de la biología molecular han permitido descubrir un sistema celular central de respuesta, sensible a cambios en la homeostasis de las proteínas, es decir, sensible al equilibrio entre síntesis, plegamiento, señalización intracelular, función biológica y degradación de las proteínas (**Figura i1**). Las HSP, inducidas por la respuesta a estrés o expresadas constitutivamente, actúan como chaperonas y son esenciales para el mantenimiento y la restauración de la homeostasis de las proteínas (Boston *et al.*, 1996; Bukau *et al.*, 2006; Nakamoto & Vigh, 2007; Scharf *et al.*, 2012). En condiciones normales, existe un equilibrio entre proteínas en estado nativo y proteínas parcialmente desnaturalizadas unidas a chaperonas. Tras un estrés ambiental, aumenta la proporción de proteínas parcialmente desnaturalizadas, produciéndose la disminución de chaperonas libres en la célula, que tiene como resultado la desnaturalización de las proteínas y problemas en el procesamiento de las proteínas de nueva síntesis durante el estrés. Esta respuesta a estrés requiere la transcripción de genes *hsp* bajo el control de factores de transcripción de choque térmico (HSF, *Heat Shock Factors*), que están presentes en el citoplasma en su forma inactiva. El estrés provoca la activación de los HSF y su transporte al núcleo, donde se unen a las secuencias dianas HSE en los promotores de los genes inducidos por estrés (**Figura i1**, pasos 1 y 2 del ciclo HSF). La síntesis *de novo* de proteínas HSP tiene como función restablecer

el equilibrio de chaperonas libres. Finalmente, se produce la restauración de los HSF a su forma inactiva (**Figura i1**, pasos 3-5 del ciclo HSF) (Wu, 1995; Scharf *et al.*, 1998a; Morimoto, 1998; Baniwal *et al.*, 2004). El proceso de activación de los HSF está regulado por chaperonas, como las proteínas HSP70 y HSP90, que actúan como reguladores negativos de los HSF (Guo *et al.*, 2001; Kim & Scöffl, 2002; Baniwal *et al.*, 2004; Hahn *et al.*, 2011).



**Figura i1.** Los Factores de transcripción de choque térmico (HSF) como reguladores centrales de la respuesta a choque térmico. Se pone como ejemplo el HSFA1a, encargado de la respuesta a choque térmico en tomate. Ver detalles en el texto. Adaptado de Baniwal *et al.* (2004).

## 2. Proteínas de Choque Térmico de bajo peso molecular.

Las proteínas HSP se identificaron inicialmente basándose en su activación durante el choque térmico, aunque posteriormente se descubrió la presencia de estas proteínas en células no estresadas. Las HSP incluyen varias familias proteicas muy conservadas. En relación a su peso molecular, estas familias HSP se clasifican en: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y HSP20 (o sHSP). Las sHSP componen una familia muy antigua de proteínas HSP, presente en los 3 dominios: Archaea, Bacteria y Eukarya (Waters, 2013). Estas proteínas son necesarias para la vida, y se encuentran presentes hasta en los genomas más pequeños. En plantas, las sHSP son importantes para la respuesta frente a estrés abiótico. En condiciones normales de crecimiento, la mayoría de las sHSP de plantas son indetectables en tejido vegetativo, pero se inducen rápidamente en respuesta a calor (Waters, 2013). Diferentes estudios han demostrado que las sHSP juegan un papel importante en la termotolerancia y adaptación de la planta al ambiente (Sorensen *et al.*, 2003; Lujan *et al.*, 2009; Amano *et al.*, 2012). Sin embargo, no existe un único patrón de expresión para todos los genes *shsp* en plantas. También se ha observado la inducción de determinados genes *shsp* por estrés biótico (Siddique *et al.*, 2008; Waters *et al.*, 2008, Sarkar *et al.*, 2009). Además, muchas sHSP se expresan durante etapas específicas del desarrollo, en ausencia de estrés exógeno. La expresión de sHSP durante la embriogénesis y maduración de la semilla es uno de los ejemplos más caracterizados de regulación en ausencia de estrés (Almoguera & Jordano, 1992; DeRocher & Vierling, 1994; Wehmeyer *et al.*, 1996; Wehmeyer & Vierling, 2000; Kotak *et al.*, 2007a). También se ha detectado la expresión de sHSP durante el desarrollo del polen y la maduración del fruto (Zarsky *et al.*, 1995; Carranco *et al.*, 1997; Neta-Sharir *et al.*, 2005; Volkov *et al.*, 2005).

### *Clasificación de las sHSP de plantas.*

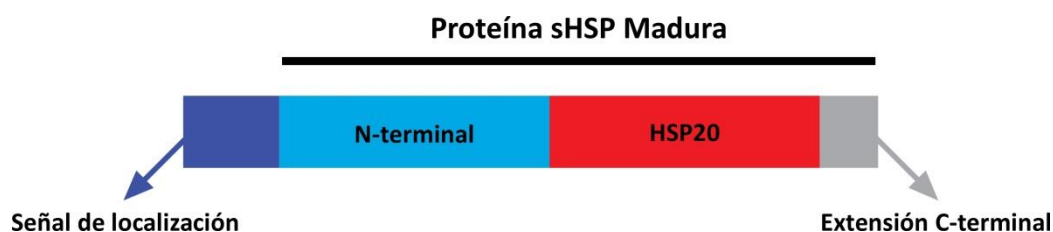
Las plantas poseen mayor cantidad de sHSP que otros organismos eucariotas, incluyendo algas. Además de su amplio número, las sHSP de plantas presentan gran diferencia en cuanto a secuencia de aminoácidos y función celular. (Waters, 2013). El número de sHSP varía según la especie vegetal, por ejemplo, se han encontrado 19 sHSP en *Arabidopsis* (Scharf *et al.*, 2001), 23 en arroz (*Oryza sativa*) y 36 en el álamo (*Populus trichocarpa*) (Waters *et al.*, 2008). Una de las mayores diferencias entre las sHSP de plantas y las de otros organismos consiste en la existencia de distintas subfamilias de sHSP vegetales. El análisis de las secuencias de los genomas

completos de angiospermas, ha permitido identificar 11 subfamilias de sHSP. Éstas incluyen 6 subfamilias de sHSP de localización citoplasmática y nuclear (CI-CVI) y 5 subfamilias localizadas en diferentes orgánulos celulares. Estas subfamilias específicas de orgánulos incluyen una subfamilia localizada en el retículo endoplasmático (ER), un subfamilia plastidial (P), otra localizada en los peroxisomas (PX) y dos subfamilias de localización mitocondrial (MTI y MTII). Diez de estas subfamilias están presentes tanto en monocotiledóneas como en eudicotiledóneas (CP, MTI, MTII, ER, PX, CI, CII, CIII, CIV, y CV). Sin embargo, la subfamilia CVI sólo ha sido encontrada en eudicotiledóneas (Waters, 2013).

### *Estructura de las sHSP.*

Aunque las proteínas pertenecientes a la superfamilia de las sHSP son diversas en cuanto a secuencia y tamaño, la mayoría poseen características comunes. Como su nombre sugiere, los monómeros de estas proteínas son de pequeño tamaño, entre 12 y 42 KDa. La mayoría de las sHSP se encuentran entre los 15-22 KDa. La secuencia primaria de aminoácidos de las sHSP se compone de una región N-terminal variable, una región C-terminal altamente conservada (dominio HSP20 o  $\alpha$ -cristalino) y una extensión C-terminal (**Figura i2**). Las sHSP con función en orgánulos o compartimentos celulares específicos también poseen una señal o etiqueta de localización N-terminal. La extensión C-terminal puede variar en secuencia y longitud, y puede poseer motivos de aminoácidos para la retención en orgánulos específicos (Waters, 2013). El alineamiento múltiple de 11 sHSP, representativas de cada subfamilia, en *Arabidopsis thaliana* ha demostrado que las sHSP de plantas mantienen conservada, al igual que el resto de sHSP, la región C-terminal o HSP20, mientras que la región N-terminal es más variable. La región HSP20 está presente en las sHSP de todos los dominios de vida, y se ha sugerido que juega un papel importante en la oligomerización (Basha *et al.*, 2012). En comparación con la región C-terminal, la región N-terminal de las sHSP de plantas es altamente variable entre las distintas subfamilias, y no se conservan regiones estructurales ni motivos entre las sHSP estudiadas. Sin embargo, la región N-terminal está considerablemente conservada dentro de cada subfamilia (Waters, 1995; Siddique *et al.*, 2008; Bondino *et al.*, 2012; Waters, 2013). La región N-terminal es importante a nivel funcional, y es esencial para la unión las proteínas sustratos (Giese *et al.*, 2005; McDonald *et al.*, 2012; Waters, 2013).





**Figura i2. Esquema de la estructura primaria de las proteínas sHSP.** Los monómeros de las proteínas sHSP contienen un dominio variable N-terminal (azul claro), un dominio conservado HSP20 o  $\alpha$ -cristalino (rojo), y una extensión C-terminal variable (gris). Las sHSP localizadas en los orgánulos, cloroplastos, mitocondrias, retículo endoplasmático y peroxisomas, poseen una secuencia señal transitoria (azul oscuro) necesaria para el transporte al orgánulo específico. Estas secuencias señal no forman parte de la proteína madura. La extensión C-terminal es variable en longitud y contiene señales de retención en el retículo endoplasmático (KDEL) o los peroxisomas (SKL), en las sHSP con función en dichos compartimentos celulares. Adaptado de Waters (2013).

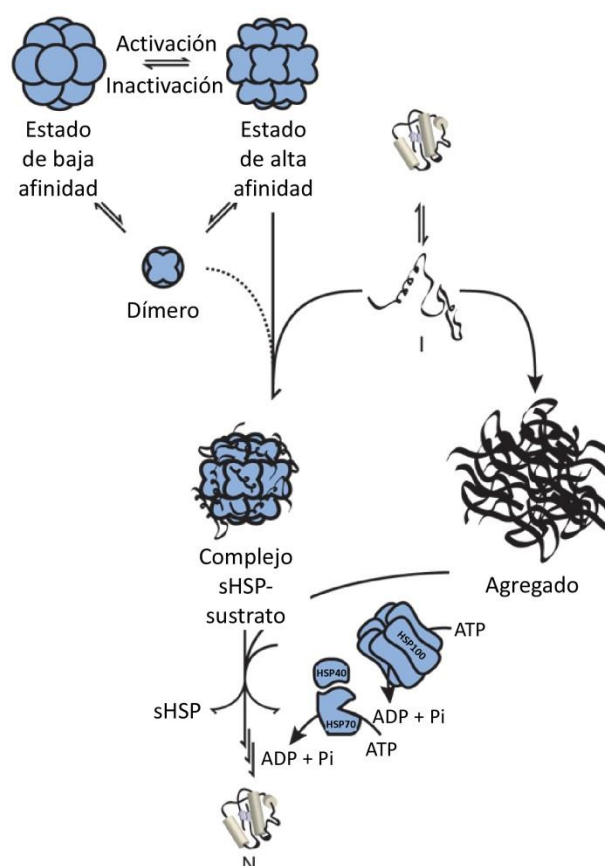
Una de las características más notables de las sHSP es la formación de grandes estructuras oligoméricas, y una estructura cuaternaria dinámica. La oligomerización de las sHSP es polidispersa, encontrándose más de un estado oligomérico (Baldwin, 2011; Waters, 2013). Esta oligomerización parece ser importante para la funcionabilidad de las sHSP (Nakamoto & Vígh, 2007). Los monómeros de las sHSP pueden unirse a través del dominio  $\alpha$ -cristalino, formando dímeros (Haslbeck *et al.*, 2005). Bajo condiciones normales, las sHSP forman generalmente oligómeros de 12 o más subunidades, y pesos moleculares de hasta aproximadamente 0,8MDa (Nakamoto & Vígh, 2007). En la actualidad, sólo se ha obtenido la estructura cristalina en alta resolución para la HSP16.5 de una arquea (*Methanocaldococcus jannaschii*) (Kim *et al.*, 1998) y la HSP16.9 de trigo (*Triticum aestivum*) (van Montfort *et al.*, 2002). En ambos casos, la estructura oligomérica se estabiliza por conexiones entre dímeros formadas por las regiones terminales de la proteína y por interacciones específicas entre los dominios  $\alpha$ -cristalinos. En estas estructuras, los extremos C-terminales se encuentran en la superficie del oligómero, permitiendo la unión con los dominios  $\alpha$ -cristalinos de dímeros adyacentes. La región N-terminal no parece ser necesaria para la oligomerización, pero contribuye a la estabilidad termodinámica del oligómero (Hilton *et al.*, 2013).

### *Funciones de las sHSP.*

Las proteínas sHSP participan en multitud de procesos celulares y protegen a la célula frente a multitud de estreses, como alta temperatura o estrés oxidativo (Nakamoto & Vigh, 2007). La función más común de la mayoría de los miembros de esta familia es su actividad chaperona, crucial para el mantenimiento de la homeostasis de las proteínas. Las sHSP suponen la primera línea de defensa celular cuando las proteínas empiezan a desnaturalizarse, y su actividad se estimula por múltiples estreses (Hilton *et al.*, 2013). La capacidad de unión de las sHSP al sustrato se potencia con cambios estructurales que dan lugar a la exposición de superficies hidrofóbicas, normalmente no expuestas en la estructura oligomérica nativa de las sHSP (Nakamoto & Vigh, 2007). Así, las sHSP actúan como chaperonas moleculares, uniéndose mediante interacciones hidrofóbicas a proteínas parcialmente desnaturalizadas para prevenir la agregación irreversible de las proteínas (Tyedmers *et al.*, 2010; Hilton *et al.*, 2013; Waters, 2013). Los modelos actuales de la función de las HSP como chaperonas celulares sugieren que las sHSP actúan junto a otras chaperonas, como las HSP100 y el sistema HSP70-HSP40, impidiendo la agregación irreversible y favoreciendo la re-solubilización de proteínas ya agregadas (**Figura i3**) (Haslbeck *et al.*, 2005). Las sHSP, a diferencia de otras HSP con función chaperona, no requieren ATP para unirse a la proteína sustrato. Además, estas proteínas tienen una capacidad muy alta para unirse a sustratos desnaturalizados (Haslbeck *et al.*, 2005; Nakamoto & Vigh, 2007; McHaourab *et al.*, 2009; Tyedmes *et al.*, 2010).

Además, las proteínas sHSP pueden interaccionar con las membranas celulares y protegerlas. Las membranas son las estructuras celulares más expuestas a estreses externos. La organización de las membranas celulares y su fluidez son muy sensibles a estrés, como altas o bajas temperaturas. La presencia de sHSP unidas a las membranas celulares está ampliamente documentada (Nakamoto & Vigh, 2007). Se ha demostrado que un grupo de HSP expresadas durante estrés por calor, a temperaturas no letales en *E. coli*, pueden interaccionar con las membranas celulares, y proteger a la célula frente a estrés por calor o estrés oxidativo (Miyake *et al.*, 1993; Kitagawa *et al.*, 2000). En cianobacterias, se ha demostrado que la proteína HSP16.6 se asocia a las membranas fotosintéticas y juega un papel importante en su estabilización durante estrés por calor (Lee *et al.*, 2000). También se ha demostrado que la expresión de la proteína HSPA en cianobacterias estabiliza las membranas tilacoidales e incrementa la estabilidad del aparato fotosintético durante estrés por calor (Nakamoto *et al.*, 2000). En eucariotas, se ha demostrado la unión reversible de las proteínas sHSP-P durante estrés por

calor a las membranas tilacoidales del alga verde *Chlamydomonas*, y la protección de la cadena de transporte de electrones en el Fotosistema II (PSII, *Photosystem II*) (Adamska & Kloppstech, 1991; Eisenberg-Domovich *et al.*, 1994). En plantas, se ha demostrado que las sHSP-M pueden proteger la cadena de transporte de electrones en las membranas mitocondriales durante estrés por calor (Downs & Heckathorn, 1998). Además, las sHSP-P pueden proteger la cadena de transporte de electrones del PSII y el Fotosistema I (PSI, *Photosystem I*) frente a estrés térmico, por frío o calor (Heckathorn *et al.*, 1998; Heckathorn *et al.*, 2002; Neta-Sharir *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2007).



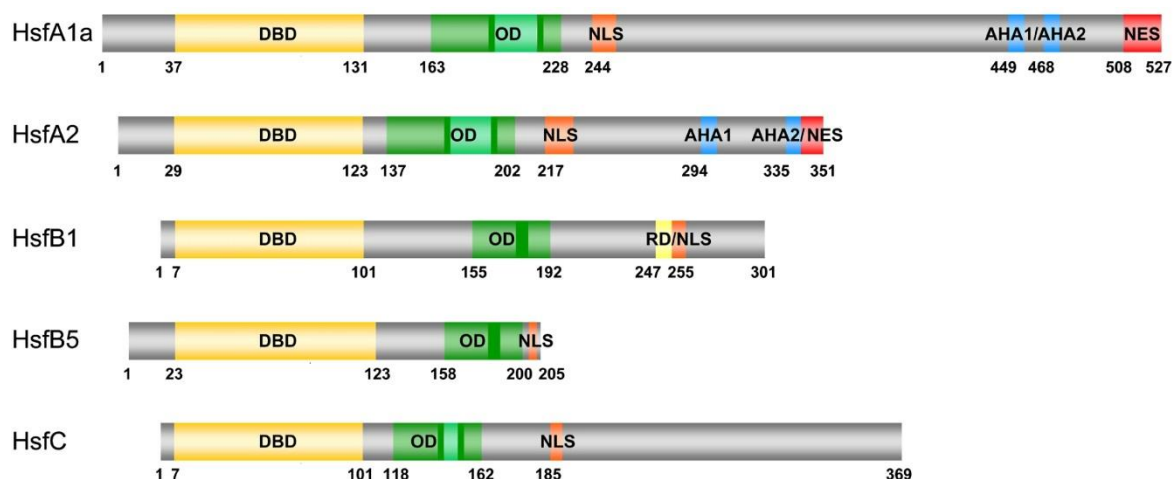
**Figura i3. Modelo para la función chaperona de las proeínas sHSP.** Las sHSP tienen estructuras oligoméricas dinámicas, cambiando permanentemente sus subunidades. En cuanto a la interacción con proteínas en estado no nativo, las sHSP existen en dos estados: un estado inactivo, con baja afinidad, y un estado activo, con alta afinidad de unión al sustrato. El equilibrio entre estos dos estados está controlado de forma dependiente de la temperatura. Cuando se produce un choque térmico, el equilibrio se desplaza a favor del estado de alta afinidad. Los oligómeros activos son capaces de unirse a las proteínas sustrato, formando complejos estables sHSP-sustrato. Esta unión previene eficientemente la agregación irreversible del sustrato. Para separar del complejo a las proteínas sustrato activas se requiere de la cooperación con otras chaperonas de las familias HSP70-HSP40 o HSP100, dependientes de ATP. Aunque las chaperonas HSP70-HSP40 y HSP100 pueden actuar directamente sobre las proteínas agregadas, la presencia de sHSP aumenta la eficiencia del proceso. Adaptado de Haslbeck *et al.* (2005).

### 3. Factores de transcripción de Choque térmico en plantas.

Las plantas terrestres están altamente adaptadas a crecer y sobrevivir bajo gran variedad de situaciones de estrés. Esto se correlaciona con la existencia de gran multiplicidad de HSF en plantas con flor (en el rango de 20-50 miembros; Scharf *et al.*, 2012). Los HSF son los componentes terminales de la cadena de transducción de señal que activa a los genes de respuesta, tanto a estrés por calor como a otra gran variedad de estreses químicos. La familia de HSF en plantas se caracteriza por la conservación de patrones de estructura y la diversificación funcional entre los distintos HSF (Morimoto, 1998; Shöffl *et al.*, 1998; Baniwal *et al.*, 2004).

#### *Estructura de los HSF.*

Al igual que otras proteínas que regulan la actividad genética, los HSF tienen una estructura modular. Su estructura básica y el modo en que reconocen al promotor están conservados en todos los organismos eucariotas, aunque existe una gran variabilidad en cuanto a tamaño y secuencia. En la **Figura i4** se muestran 5 ejemplos de HSF de tomate (*Solanum lycopersicum*), que presentan las características típicas de la estructura de los HSF vegetales, las cuales se resumen a continuación (Nover *et al.*, 2001; Baniwal *et al.*, 2004; Scharf *et al.*, 2012). Cerca del extremo N-terminal de todos los HSF, se localiza el dominio de unión a ADN (DBD, *DNA Binding Domain*). Este dominio está altamente estructurado, y presenta gran conservación evolutiva. Su núcleo hidrofóbico asegura el posicionamiento preciso y la interacción altamente selectiva del dominio DBD con los elementos de estrés térmico HSE (*Heat Stress Elements*), localizados en los promotores de los genes activados por dichos HSF. El dominio de oligomerización OD (*Oligomerization Domain*) o región HR-A/B está conectado con el dominio DBD por un enlace flexible de longitud variable (15-80 aminoácidos). El OD está formado por dos regiones con repeticiones de residuos hidrofóbicos (HR-A/B), en las que se repite un patrón de siete residuos de aminoácidos hidrofóbicos. Basándonos en el OD, podemos diferenciar 3 clases de HSF en plantas: clases A, B y C. Los HSF de clase B poseen una región HR-A/B compacta, similar las de otros HSF de especies no vegetales, mientras que en los HSF de clases A y C esta región es más extensa, debido a la inserción de 21 (clase A) o 7 (clase C) residuos de aminoácidos entre las partes A y B. El dominio OD confiere diferentes patrones de especificidad para la hetero-oligomerización. La señal de localización nuclear NLS (*Nuclear Localization Signal*), localizada tras la región C-terminal del OD, está compuesta por una o dos agrupaciones de residuos de



**Figura i4. Estructura básica de los HSF.** Ejemplos de la estructura básica de 5 HSF de tomate, alineados con respecto al inicio del dominio de unión al ADN (DBD): OD, dominio de oligomerización (región HR-A/B); NLS, señal de localización nuclear; NES, señal de exportación nuclear; AHA, motivos de activación; RD, motivos de tetrapéptidos -LFGV- del dominio represor. Ver detalles en el texto. (Adaptado de Scharf *et al.*, 2012)

aminoácidos básicos. Estos motivos, con carga positiva, favorecen el ensamblaje del complejo de importación nuclear. Dependiendo del balance entre la importación y exportación nuclear, la distribución celular de los HSF entre el núcleo y el citoplasma cambia dinámicamente. En el extremo C-terminal de algunos HSF de clase A, existe una señal hidrofóbica de exportación nuclear NES (*Nuclear Export Signal*). Esta región, frecuentemente rica en leucinas, es necesaria para la exportación nuclear mediada por el receptor NES. Junto con los módulos de activación adyacentes (motivos AHA), NES forma parte de una marca de señalización específica en la región C-terminal de los HSF de clase A. La región C-terminal es la menos conservada entre los HSF y en ella se encuentra el dominio de activación. Los HSF de clase A presentan regiones peptídicas de activación con corta longitud (motivos AHA), localizadas en los dominios C-terminales. Estos motivos se caracterizan por la presencia de residuos de aminoácidos aromáticos (W, F, Y), hidrofóbicos (L, I, V) y ácidos (E, D). En los HSF de tipo A3, el dominio C-terminal no contiene motivos AHA, pero conservan un patrón característico de residuos de triptófano (W), con función activadora. Estas regiones representan sitios esenciales para el contacto con las subunidades del complejo basal de transcripción. El dominio C-terminal de los HSF vegetales de clase B y C tiene carga positiva o neutra, y carece de motivos AHA. Esto se correlaciona con la falta de actividad transcripcional en ensayos funcionales *in vivo* (Boscheinen *et al.*, 1997). Además los HSF de clase B y C de Arabidopsis no son capaces de interactuar con la maquinaria

basal de transcripción (Kotak *et al.*, 2004). Todos los HSF de clase B, excepto el HSFB5, se caracterizan por la presencia del tetrapéptido -LFGV- en el extremo C-terminal, conectado a la señal NLS. Este dominio interacciona con un co-represor desconocido en la maquinaria de transcripción (Scharf *et al.*, 2012).

### *Diversidad funcional de los HSF de plantas.*

La familia de los HSF presenta una gran complejidad en plantas, con numerosos miembros y un alto grado de especialización funcional (Koskull-Döring *et al.*, 2007). Esto contrasta con la situación en otros organismos eucariotas: en levaduras o *Drosophila* sólo se conoce un único HSF. La secuenciación del genoma de *Arabidopsis* permitió identificar 21 miembros pertenecientes a esta familia (Nover *et al.*, 2001). En otras especies vegetales como soja se han identificado 34 HSF, 23 en arroz, más de 16 en tomate, y al menos 19 en *Medicago truncatula* (Baniwal *et al.*, 2004; Kotak *et al.*, 2004; Benedito *et al.*, 2008). El conocimiento actual de los mecanismos moleculares del funcionamiento de los HSF, está basado principalmente en los análisis de los HSF de tomate y *Arabidopsis* (Baniwal *et al.*, 2004; Miller & Mittler, 2006; von Koskull-Döring *et al.*, 2007; y Kotak *et al.*, 2007b).

En tomate (*Lycopersicon peruvianum*), los factores *LpHSFA1a*, *LpHSFA2* y *LpHSFB1* conforman la red de regulación responsable de la expresión de los genes que responden a choque térmico (Baniwal *et al.*, 2004). El factor *LpHSFA1a* se expresa constitutivamente y regula la expresión inducida por calor de *LpHSFA2* y *LpHSFB1*. *LpHSFA1a* es el “regulador maestro” de la respuesta a calor, y no puede ser reemplazado en esta función por ningún otro HSF, al menos *in planta* (Mishra *et al.*, 2002). Los ensayos de ganancia de función, mediante la sobreexpresión de este factor en plantas transgénicas, resultan en un incremento de la termotolerancia basal. Por el contrario, cuando se silencia la expresión de *LpHSFA1a*, se incrementa la sensibilidad de la planta a altas temperaturas, sugiriendo que la función de *LpHSFA1a* no puede compensarse con otros HSF. Sin embargo en *Arabidopsis thaliana* no se ha encontrado un factor funcionalmente equivalente a *LpHSFA1a*, en cuanto a su papel irremplazable como regulador de la respuesta a choque térmico. De este modo, mutantes *knockout* simples de *AtHSFA1a*, *AtHSF1b*, *AtHSF1d* o *AtHSF1e*, así como mutantes *knockout* dobles o triples, no mostraron efectos en la respuesta a choque térmico, ni en los niveles de termotolerancia basal (Lohmann *et al.*, 2004; Nishizawa-Yokoi *et al.*, 2011). Sin embargo, el estudio de un mutante *knockout* cuádruple, con pérdida de

función de las cuatro formas AtHSFA1, dio como resultado la pérdida de respuesta a choque térmico y termotolerancia adquirida, así como defectos en el desarrollo (Liu *et al.*, 2011).

El factor HSFA2 es similar al HSFA1 tanto estructural como funcionalmente, aunque sólo se expresa en plantas estresadas (von Koskull-Doring *et al.*, 2000). HSFA2 es la proteína con mayor activación transcripcional en tomate, *Arabidopsis* y arroz, acumulándose a niveles altos en plantas expuestas a ciclos repetidos de choque térmico y recuperación (Scharf *et al.*, 1998b; Mishra *et al.*, 2002; Schramm *et al.*, 2006; Charng *et al.*, 2007; Nishizawa-Yokoi *et al.*, 2009). En tomate, la síntesis de LpHSFA2 está controlada por la activación tras el choque térmico de LpHSFA1a (Mishra *et al.*, 2002). Debido a su potente señal de exportación NES, LpHSFA2 no se localiza en el núcleo a menos que se co-exprese junto a LpHSFA1a, con el que interacciona físicamente (Scharf *et al.*, 1998b). En plantas estresadas, LpHSFA1 y LpHSFA2 hetero-oligomerizan formando un complejo super-activador para los genes *hsp*, cuya actividad es mucho mayor que la observada en los dos HSF individualmente (Scharf *et al.*, 1998b; Chan-Schamnet *et al.*, 2009). En *Arabidopsis*, mutantes *knockout* para AtHSFA2 mostraron sensibilidad a choque térmico, alta luminosidad, estrés oxidativo y anoxia, mientras que plantas con alta expresión de AtHSFA2 mostraron mayores niveles de termotolerancia, así como mayor resistencia a estrés salino/osmótico (Ogawa *et al.*, 2007; Yokotani *et al.*, 2008), estrés oxidativo (Zhang *et al.*, 2009) y anoxia (Banti *et al.*, 2010). El factor HSFA2 puede considerarse como uno de los reguladores maestros de la respuesta a estrés en plantas, protegiendo contra el daño oxidativo de los orgánulos y consecuente muerte celular (Zhang *et al.*, 2009).

A diferencia de lo que ocurre con los HSF de clase A, un gran número de HSF de clase B y C son inactivos a nivel transcripcional por sí mismos, ya que carecen de los motivos AHA, necesarios para interaccionar con la maquinaria basal de transcripción (Bharti *et al.*, 2004; Kotak *et al.*, 2004). Sin embargo, bajo ciertas condiciones, el HSF inducido por choque térmico LpHSFB1 puede actuar como co-activador, cooperando con los HSF de clase A, como el factor LpHSFA1a. Los dos HSF ensamblan un complejo que activa la transcripción de forma sinérgica. Además, LpHSFB1 también coopera de forma similar con otras proteínas activadoras de la transcripción, que controlan la expresión de genes de mantenimiento. De esta forma, LpHSFB1 ayuda a restaurar la expresión de dichos genes de mantenimiento, y se consigue reprogramar a la célula para la recuperación tras el choque térmico (Bharti *et al.*, 2004).



La estructura y función del factor HSFA3 es similar a la de HSFA1a y HSFA2, excepto en la parte C-terminal del dominio de activación, que aparece más difuso con un patrón conservado de residuos de triptófano (Bharti *et al.*, 2000; Tripp *et al.*, 2009). La expresión inducida por estrés hídrico y por calor de AtHSFA3 en Arabidopsis, depende del factor de transcripción DREB2A (*Dehydration-Responsive Element Binding Protein*). Lo mismo ocurre con los genes *hsp18.1-CI*, *hsp26.5-MII* y *hsp70* (Sakuma *et al.*, 2006; Schramm *et al.*, 2008). La sobreexpresión de DREB2A o DREB2C provoca la inducción de HSFA3, y consecuentemente la de otros genes relacionados con la respuesta a choque térmico. Esta observación se correlaciona con una mayor termotolerancia basal, mientras que en los mutantes *knockout* para *dreb2A* dicha tolerancia disminuye. Se han obtenido resultados similares al sobreexpresar el factor DREB2A de maíz (*Zea mays*) en Arabidopsis (Qin *et al.*, 2007). Los ensayos de ganancia o pérdida de función *in planta* para AtHSFA3, indican que dicho factor tiene una función importante en la adquisición de termotolerancia vegetativa (Yoshida *et al.*, 2008; Schramm *et al.*, 2008).

Aunque el análisis funcional detallado se limita a pocos ejemplos, el análisis alternativo de los patrones de expresión genética mediante *microarrays* ha permitido la elaboración de la base de datos *AtGenExpress*, que proporciona información muy completa la expresión de los HSF en el transcriptoma de Arabidopsis durante el desarrollo y durante la respuesta tanto a estrés biótico como estrés abiótico (Schmid *et al.*, 2005; Miller & Mittler, 2006; Kilian *et al.*, 2007; von Koschull-Döring *et al.*, 2007; Scharf *et al.*, 2012). Obviamente, los niveles de ARNm no permiten sacar conclusiones inmediatas sobre los niveles de acumulación de proteína. En Arabidopsis, sólo existen datos correspondientes a acumulación a nivel proteico para HSFA2 y HSFA9 (Schramm *et al.*, 2006; Kotak *et al.*, 2007a). Desafortunadamente, no existen bases de datos comparables para otras plantas. Sin embargo, se han descrito cambios complejos en los niveles de ARNm de HSF de arroz durante el desarrollo, así como en respuesta a estrés por calor, frío y estrés oxidativo (Wang *et al.*, 2009; Mittal *et al.*, 2009; Narsai *et al.*, 2010).

#### 4. El factor HSFA9, un HSF esencial para la expresión de HSP durante el desarrollo embrionario en plantas.

Durante la maduración de la semilla, se activan diferentes programas de expresión genética que promueven mecanismos de protección y reparación del daño producido por la desecación

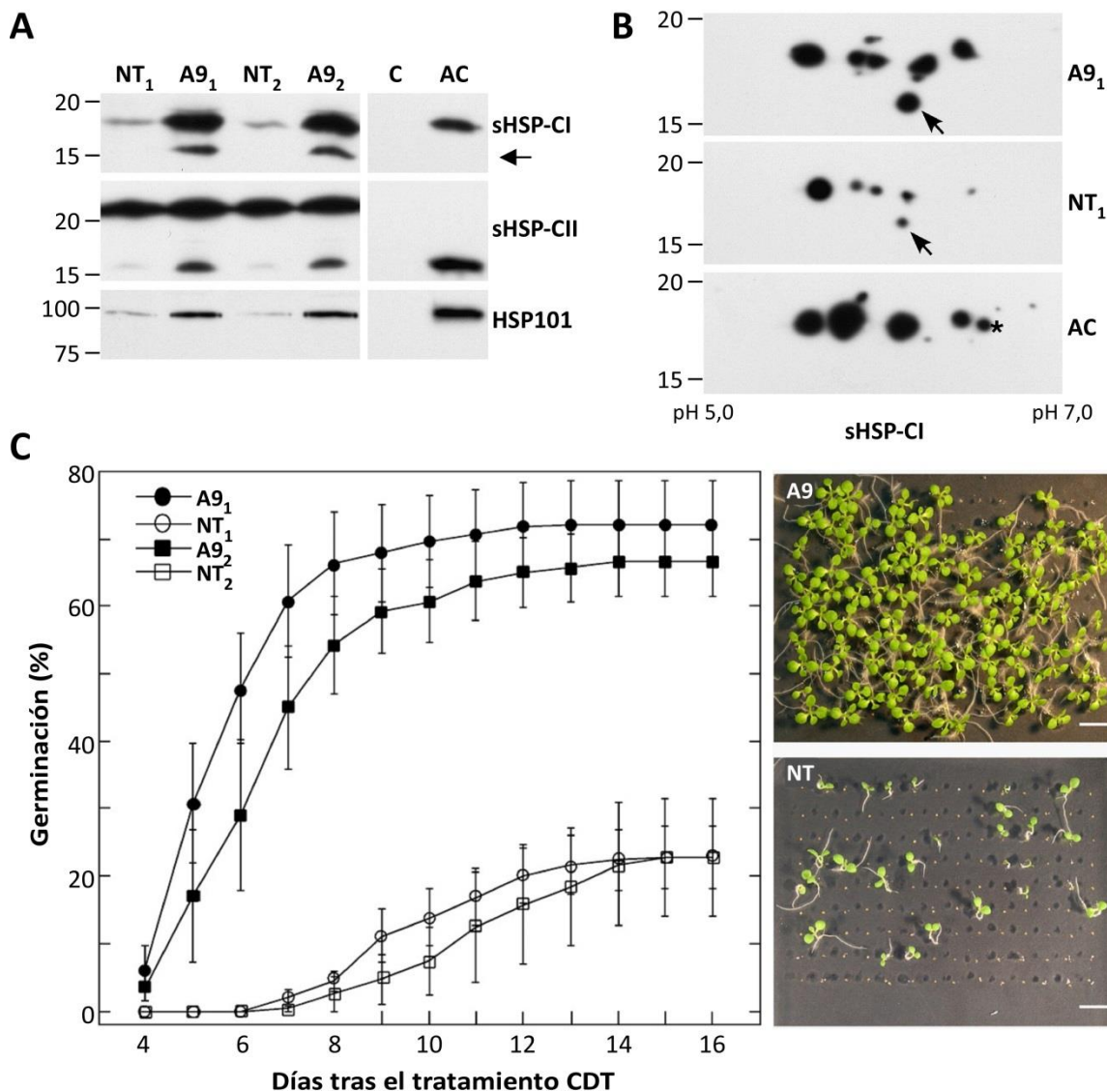


severa y, al mismo tiempo, prolongan la supervivencia de las semillas maduras secas (Rajjou & Debeaujon, 2008; Chen *et al.*, 2012; Chatelain *et al.*, 2013). Tras la germinación, sólo las plantas de resurrección pueden tolerar niveles tan drásticos de deshidratación u otros estreses abióticos (Cushman & Oliver, 2011; Gechev *et al.*, 2012). En plantas de resurrección, aparecen activos en tejidos vegetativos los mismos programas genéticos expresados durante el desarrollo embrionario (Illing *et al.*, 2005; Farrant & Moore, 2011). En girasol (*Helianthus annuus* L.), uno de estos programas, el cual ha sido extensamente estudiado en nuestro laboratorio, está bajo el control transcripcional de factores HSF, entre los que se incluye el factor específico de semillas *HaHSFA9* (Almoguera *et al.*, 2002; Tejedor-Cano *et al.*, 2010).

El papel único de *HaHSFA9* durante el desarrollo de la semilla puede considerarse el ejemplo más claro de diversificación funcional entre los HSF de plantas. Nuestro grupo caracterizó el factor *HaHSFA9* como el primer HSF expresado específicamente durante la embriogénesis y maduración de la semilla (Almoguera *et al.*, 2002). La actividad de *HaHSFA9* está regulada por auxinas, ya que la proteína Aux/IAA *HaIAA27*, reprime la expresión de *HaHSFA9* en embriones de girasol (Carranco *et al.*, 2010). Posteriormente, se ha identificado el factor homólogo *AtHSFA9* en *Arabidopsis*, que al igual que *HaHSFA9*, se expresa exclusivamente durante el desarrollo embrionario, y no se induce en tejido vegetativo en respuesta a ningún tipo de estrés. La expresión de *AtHSFA9* está controlada por el factor de transcripción específico de semillas *ABI3* (*Abciscic Acid-Insensitive 3*). Además, los transcritos de los genes homólogos a *HSFA9* en tomate y café sólo se detectan en semillas, y no en tejido vegetativo (Kotak *et al.*, 2007a).

### ***El factor HaHSFA9 induce la acumulación de proteínas HSP y aumenta la longevidad en semillas.***

En nuestro laboratorio (Prieto-Dapena *et al.*, 2006), se estudiaron los efectos de la sobreexpresión de *HaHSFA9* en semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum*), bajo el control del promotor *HaDS10G1* (en las semillas DS10:A9). Este promotor pertenece a un gen tipo LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) que se expresa en semillas de girasol durante su maduración. La sobreexpresión específica en semillas de *HaHSFA9* resultó en un aumento en la acumulación de proteínas HSP101, sHSP-CI y sHSP-CII (**Figura i5A**). Entre las HSP inducidas por *HaHSFA9* en semillas se incluye una isoforma sHSP-CI específica de semillas, que no se induce durante



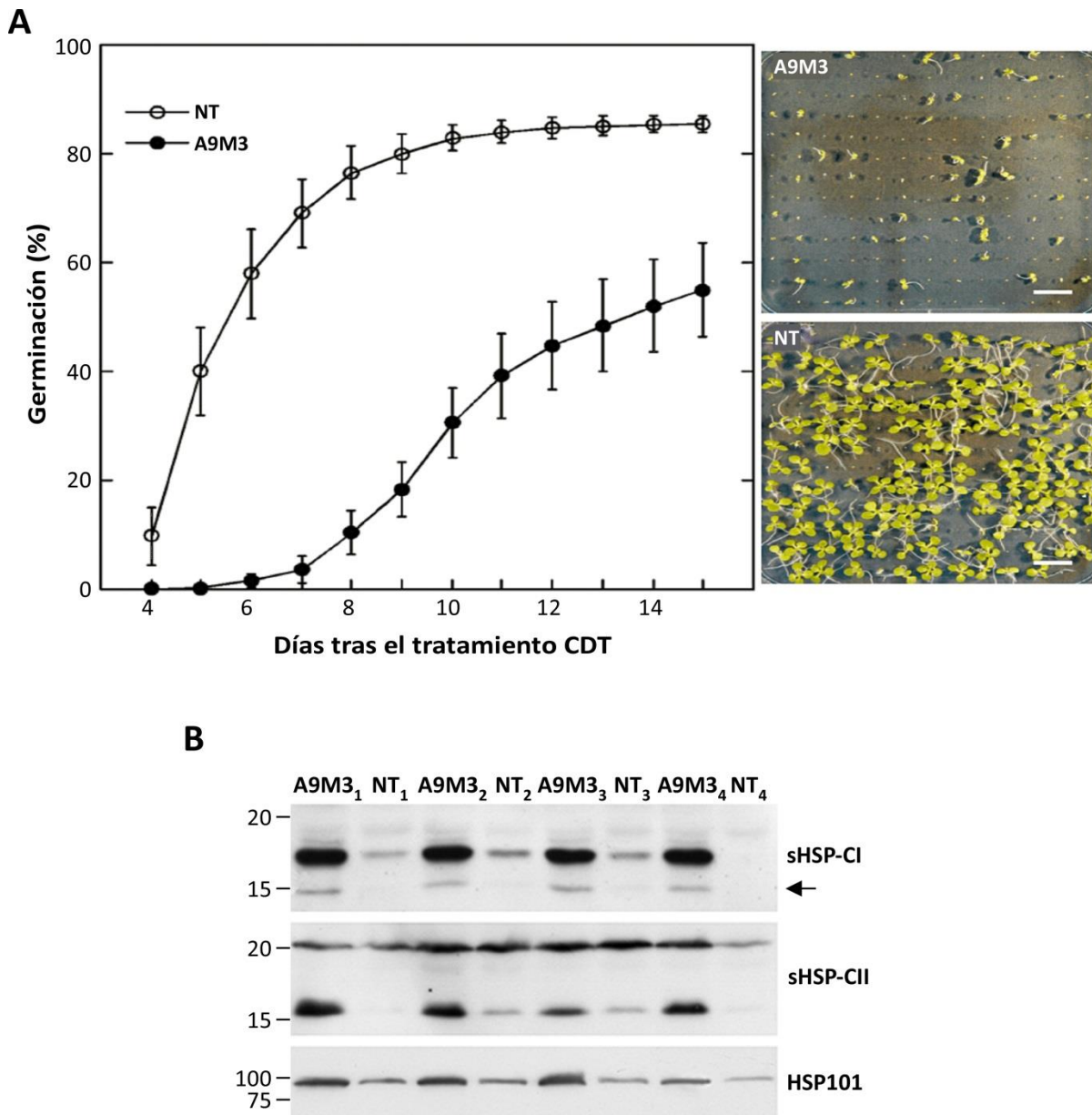
**Figura i5. Efectos de la sobreexpresión del factor *HaHSFA9* en las semillas transgénicas de tabaco DS10:A9.** (A) Detección de la acumulación de proteínas HSP101, sHSP-Cl y sHSP-CII en semillas maduras DS10:A9 por *western blot* tras electroforesis desnaturizante SDS-PAGE. Se analizaron dos líneas de semillas transgénicas de tabaco DS10:A9 (A9<sub>1</sub> y A9<sub>2</sub>), y sus hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub> y NT<sub>2</sub>). Se compara la acumulación en semillas maduras con la observada en plántulas NT en condiciones normales de cultivo (C) y tras un tratamiento de aclimatación al calor durante 3 h a 40 °C (AC). (B) Detección de la acumulación de sHSP-Cl en semillas transgénicas de tabaco DS10:A9 (A9<sub>1</sub>), y su correspondiente hermana NT (NT<sub>1</sub>), por *western blot* tras electroforesis 2D-PAGE. Se compara la acumulación en semillas maduras con la observada en plántulas NT tras un tratamiento de aclimatación al calor durante 3 h a 40 °C (AC). En la parte inferior, se indica el rango de pH (pH 5,0-7,0). (C) Resistencia a tratamientos de deterioro controlado CDT (envejecimiento artificial) de las semillas DS10:A9. Porcentaje de germinación a varios tiempos tras el tratamiento CDT, observado con semillas de 2 líneas transgénicas DS10:A9 (A9<sub>1</sub> y A9<sub>2</sub>) y sus hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub> y NT<sub>2</sub>). A la derecha se muestran fotografías representativas de la germinación después de 16 días tras el tratamiento CDT de una línea DS10:A9 y su correspondiente hermana NT. Las barras de escala equivalen a 1cm. Las flechas indican el polipéptido sHSP-Cl específico de semillas. El asterisco indica el polipéptido sHSP-Cl específico de aclimatación al calor, no detectable en semillas. A la izquierda, se indican los marcadores de peso molecular (kDa). A la derecha, se indica el anticuerpo específico usado para la detección de cada proteína. Adaptado de Prieto-Dapena *et al.* (2006).

aclimatación al calor (**Figura i5B**). Sin embargo, la sobreexpresión de *HaHSFA9* no afectó a la expresión de otros programas genéticos relacionados con la tolerancia a la desecación embrionaria, como los que determinan la acumulación en semillas de proteínas LEA, sacarosa y distintos oligosacáridos de tipo rafinosa. Este aumento de proteínas HSP se correlaciona con la mejora de la longevidad de las semillas DS10:A9 (**Figura i5C**). Los tratamientos de deterioro controlado CDT (*Controlled Deterioration Treatment*) permiten evaluar de forma rápida la longevidad de semillas. Las semillas DS10:A9 aumentaron la tasa de germinación con respecto a sus hermanas no transgénicas, tras ensayos CDT, lo cual implica una mejora en la longevidad de las semillas (**Figura i5C**; Prieto-Dapena *et al.*, 2006).

Posteriormente, estos resultados se confirmaron en semillas de tabaco con pérdida de función del factor HSFA9 endógeno, mediante la sobreexpresión de diferentes formas modificadas de *HaHSFA9* (Tejedor-Cano *et al.*, 2010). Significativamente, sólo la sobreexpresión en semillas de una forma represora activa de *HaHSFA9* (en las semillas DS10:A9M3), y no así la sobreexpresión de formas inactivas, produjeron la disminución de la longevidad de las semillas (**Figura i6A**). Tejedor-Cano *et al.*, 2010). Además, las semillas DS10:A9M3 también mostraron una notable reducción en la acumulación de sHSP-CI, sHSP-CII y HSP101, con respecto a sus hermanas no transgénicas (**Figura i6B**, Tejedor-Cano *et al.*, 2010). La sobreexpresión en semillas de formas estabilizadas de *HaIAA27* también redujo la longevidad de las semillas a niveles similares a los observados en las semillas DS10:A9M3 (Carranco *et al.*, 2010). Estos resultados indican que el programa genético activado por HSFA9 requiere otros HSF adicionales (en número desconocido, al menos otro factor). Estos factores, al igual que *HaHSFA9*, serían HSF de clase A, se reprimirían por *HaIAA27* y formarían hetero-oligómeros junto con *HaHSFA9*.

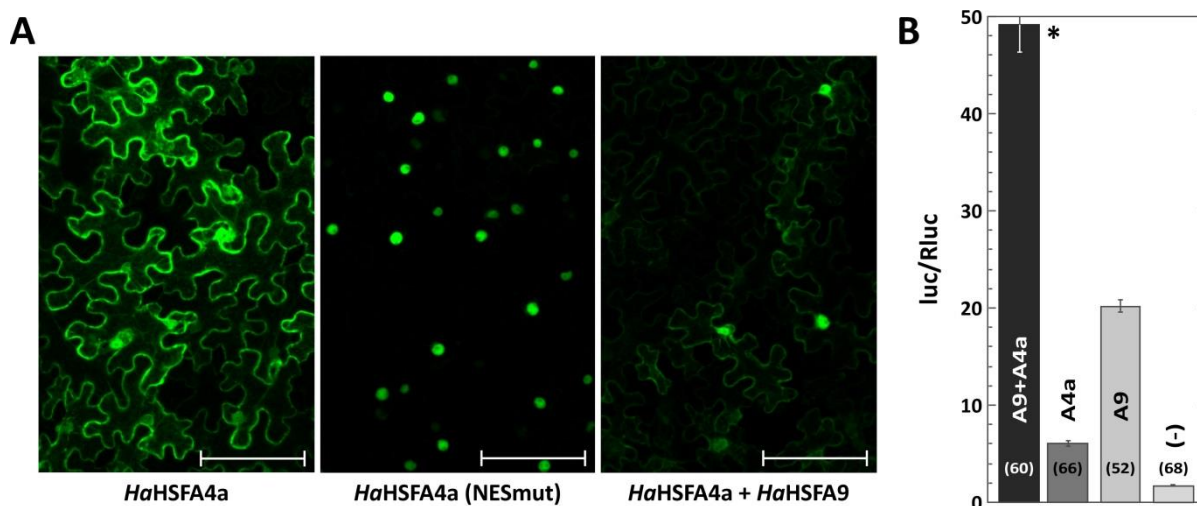
### **Interacción funcional entre los factores *HaHSFA9* y *HaHSFA4a*.**

En nuestro laboratorio se ha aislado y caracterizado el factor HSFA4a de girasol (*HaHSFA4a*) (**Figura i7**; Tejedor-Cano *et al.*, 2014). Este HSF se clonó por interacción con *HaHSFA9* mediante ensayos de doble híbrido en levaduras, a partir de una genoteca de ADNc de embriones inmaduros de girasol. La expresión de *HaHSFA4a* en hojas de *Nicotiana benthamiana*, ha mostrado que *HaHSFA4a* posee localización tanto citosólica como nuclear. Sin embargo, la interacción entre *HaHSFA4a* y *HaHSFA9* tiene lugar en el núcleo. Mediante ensayos de co-expresión se ha observado que, en presencia de *HaHSFA9*, se produce la retención de *HaHSFA4a*



**Figura i6. Pérdida de función en las semillas transgénicas de tabaco DS10:A9M3.** (A) Resistencia a tratamientos de deterioro controlado CDT (envejecimiento artificial) de las semillas DS10:A9M3. Porcentaje de germinación a varios tiempos tras el tratamiento CDT, observado con semillas de 4 líneas transgénicas DS10:A9M3 (A9M3) y sus hermanas no transgénicas (NT). A la derecha se muestran fotografías representativas de la germinación después de 15 días tras el tratamiento CDT de una línea DS10:A9M3 y su correspondiente hermana NT. Las barras de escala equivalen a 1cm. (B) Detección de la acumulación de proteínas HSP101, sHSP-CI y sHSP-CII en semillas maduras DS10:A9M3 por *western blot* tras electroforesis desnaturizante SDS-PAGE. Se analizaron 4 líneas de semillas transgénicas de tabaco DS10:A9M3 (A9M3<sub>1</sub>-A9M3<sub>4</sub>), y sus hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub>-NT<sub>4</sub>). La flecha indica el polipéptido sHSP-CI específico de semillas. A la izquierda, se indican los marcadores de peso molecular (kDa). A la derecha, se indica el anticuerpo específico usado para la detección de cada proteína. Adaptado de Tejedor-Cano *et al.* (2010).

en el núcleo, al igual que ocurre la expresar una forma de *HaHSFA4a* con un dominio de exportación nuclear NES no funcional (**Figura i7A**). Además, los ensayos de expresión transitoria mediante co-bombardamiento han demostrado que juntos, *HaHSFA4a* y *HaHSFA9* pueden co-activar sinérgicamente la transcripción a partir de los promotores de genes *hsp* dianas de *HaHSFA9*. Sin embargo, el factor *HaHSFA4a* en solitario no es capaz de activar dichos promotores (**Figura i7B**; Tejedor-Cano *et al.*, 2014).



**Figura i7. Interacción funcional entre los factores *HaHSFA9* y *HaHSFA4a*.** (A) Ensayos de localización mediante la expresión en hojas de *Nicotiana benthamiana* de: el factor *HaHSFA4a* (*HaHSFA4a*:GFP); un mutante del factor *HaHSFA4a* con el dominio NES no funcional, *HaHSFA4a*(NESmut) (*HaHSFA4a*(NESmut):GFP), y la co-expresión de los factores *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* (*HaHSFA4a*:GFP). Las barras de escala equivalen a 100 mm. (B) Ensayos de co-combardeo de los factores *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* en hojas de girasol. Entre paréntesis se indica el número de medidas para cada valor promedio. Adaptado de Tejedor-Cano *et al.* (2014).

Por otro lado, los ensayos de BiFC han demostrado que, al igual que ocurre con *HaHSFA9*, el factor *HaHSFA4a* interacciona con *HalAA27*, *in planta*. Esta interacción tiene lugar tanto en el núcleo como en el citosol, mientras que la interacción entre *HaHSFA9* y *HalAA27* ocurre sólo en el núcleo. Además, al co-expresar junto a *HaHSFA4a* y *HaHSFA9* una forma estabilizada de *HalAA27* (*HalAA27mllab*), se ha observado una reducción sustancial de la interacción entre los dos HSF. Tanto la hetero-oligomerización entre *HaHSFA4a* y *HaHSFA9*, como la interacción de *HalAA27* con *HaHSFA9* se llevan a cabo mediante el dominio OD del HSF (Carranco *et al.*, 2010; Scharf *et al.*, 2012). Así, se ha observado que *HalAA27* reprime la co-activación sinérgica mediada por *HaHSFA9* y *HaHSFA4a*, al co-expresarlos en embriones inmaduros de girasol (Tejedor-Cano *et al.*, 2014). Estos resultados apuntan a que el factor *HaHSFA4a* podría ser uno



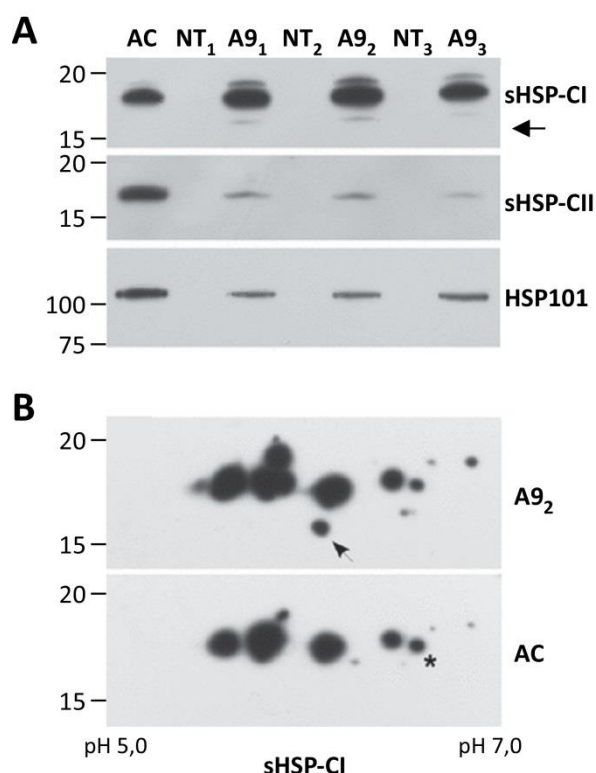
de los HSF de clase A adicionales que participan junto a *HaHSFA9* en la activación del programa genético implicado en la longevidad de semillas.

Los factores del grupo HSFA4 se caracterizan por la presencia de la secuencia PVHSHS inmediatamente tras el dominio DBD (Friedberg *et al.*, 2006; Scharf *et al.*, 2012). En la actualidad, los estudios funcionales de los factores HSFA4 son muy escasos. Existen indicios experimentales que muestran una función especializada de los miembros del grupo HSFA4: Un mutante de HSFA4d de arroz (*Spl7*), con una transición Trp>Cys en la hebra  $\beta$ 1 del dominio DBD, muestra lesiones necróticas espontáneas en hojas, debido a hipersensibilidad a condiciones de estrés moderado (Yamanouchi *et al.*, 2002); plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan una forma dominante negativa de HSFA4a, tienen efectos negativos en la respuesta a estrés oxidativo, y disminuye la acumulación de la enzima ascorbato peroxidasa 1 (APX1), y viceversa: una línea *knockout* para *APX1* muestra desregulación positiva de HSFA4a (Davletova *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2006); Los factores HSFA4a de trigo y arroz confieren tolerancia a cadmio en levaduras sensibles a Cd, así como a plantas de arroz que sobreexpresan el factor HSFA4a de trigo. Sin embargo, HSFA4d no confiere esta tolerancia. Estos resultados se correlacionan con un gran aumento de los niveles de transcritos de HSFA4a en las raíces de trigo y arroz expuestos a estrés por cadmio. Además, mutantes *knockout* para HSFA4a muestran hipersensibilidad a Cd (Shim *et al.*, 2009).

### **La sobreexpresión ectópica del factor *HaHSFA9* confiere tolerancia a deshidratación severa.**

La deshidratación es el estrés abiótico más común en las plantas terrestres, produciendo daños en las células y en los tejidos vegetales, que pueden conllevar la muerte de la planta (Zhu, 2002). Algunas especies son extremadamente sensibles a la pérdida de agua, mostrando síntomas de daño con pérdidas del 10 % del contenido normal de agua, mientras que otras especies son tolerantes a la deshidratación (Zhu, 2002; Black & Pritchard, 2002; Proctor *et al.*, 2007). Las plantas de resurrección tienen la capacidad de sobrevivir a deshidrataciones extremas o desecaciones, tolerando pérdidas superiores al 95 % del contenido normal de agua. Los mecanismos de tolerancia a desecación son comunes en briofitas y líquenes, menos común en pteridofitas, raro en angiospermas, e inexistentes en gimnospermas (Farrant *et al.*, 2007; Porembski, 2011). Las plantas de resurrección pueden permanecer en un estado

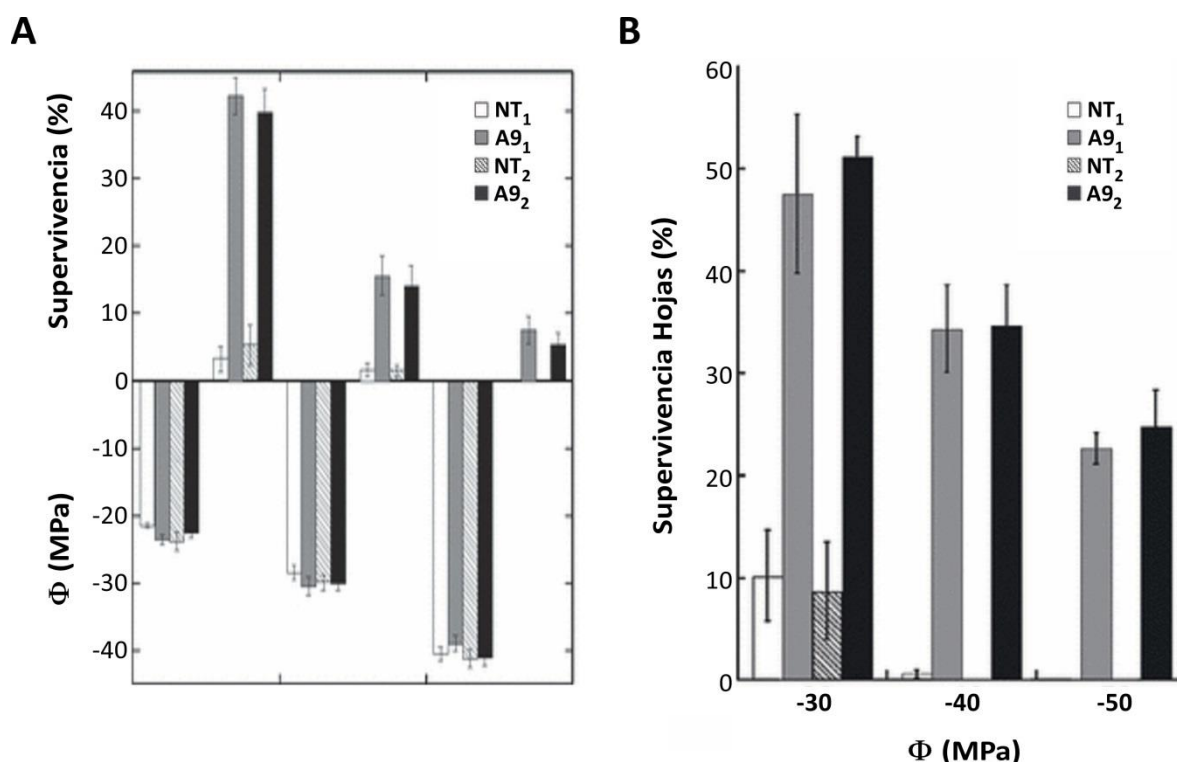
fisiológicamente inactivo durante periodos prolongados de desecación y volver rápidamente a crecer vegetativamente tras la rehidratación. La tolerancia a deshidratación o a la desecación se correlaciona con la presencia de cantidades considerables de oligosacaridos no reducibles, solutos compatibles y proteínas específicas como las proteínas LEA y las HSP (Folkert *et al.*, 2001).



**Figura i8. Acumulación de proteínas HSP en plántulas con sobreexpresión ectópica del factor *HaHSFA9* (35S:A9).** Detección de la acumulación de proteínas HSP101, sHSP-CI y sHSP-CII en plántulas de tabaco transgénicas de 3-4 semanas 35S:A9 (A9) y sus correspondientes líneas hermanas no transgénicas (NT), mediante *western blot* tras electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE y 2D-PAGE. **(A)** Acumulación de HSP en plántulas de 3 líneas transgénicas de tabaco DS10:A9 (A9<sub>1</sub>, A9<sub>2</sub> y A9<sub>3</sub>) y sus hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub>, NT<sub>2</sub> y NT<sub>3</sub>), en condiciones normales de cultivo. Se compara a acumulación bajo condiciones normales de cultivo con la observada en plántulas NT tras un tratamiento de aclimatación al calor durante 3 h a 40 °C (AC). A la derecha, se indica el anticuerpo específico usado para la detección de cada proteína. **(B)** Acumulación de sHSP-CI en plántulas 35S:A9 (A9<sub>2</sub>) bajo condiciones normales de cultivo, y su correspondiente hermana NT tras un tratamiento de aclimatación al calor durante 3 h a 40 °C (AC), mediante *western blot* tras electroforesis 2D-PAGE. En la parte inferior, se indica el rango de pH (pH 5,0-7,0). Las flechas indican el polipéptido sHSP-CI específico de semillas. El asterisco indica el polipéptido sHSP-CI específico de aclimatación al calor, no detectable en semillas. A la izquierda, se indican los marcadores de peso molecular (KDa). Adaptado de Prieto-Dapena *et al.* (2008).

En nuestro laboratorio (Prieto-Dapena *et al.*, 2008), se han estudiado los efectos de la sobreexpresión ectópica del factor *HaHSFA9* en plántulas transgénicas de tabaco, bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S (*Cauliflower mosaic virus*) (**Figura i8**). Estas plántulas (líneas 35S:A9), al igual que se observó en las semillas con sobreexpresión de *HaHSFA9*, mostraron inducción de genes *hsp*, 3-4 semanas después de la germinación. Así, en tejidos vegetativos y a temperaturas normales de crecimiento, se observó la acumulación de proteínas HSP101, sHSP-CI y sHSP-CII, a niveles comparables a los alcanzados en las plántulas no transgénicas tras aclimatación al calor durante 3 h a 40 °C (**Figura i8A**). Estas HSP ectópicamente acumuladas en las plántulas 35S:A9 incluían la isoforma sHSP-CI específica de semillas (**Figura i8B**; Prieto-Dapena *et al.*, 2006). La sobreexpresión ectópica de *HaHSFA9* en plántulas no afectó los niveles de sacarosa, rafinosa, ni proteínas LEA, al igual que se había observado al sobreexpresar *HaHSFA9* en semillas. Por tanto, los efectos moleculares inducidos por el factor *HaHSFA9* en plántulas de tabaco transgénicas son similares a los observados previamente durante la sobreexpresión en semillas de este factor de transcripción. Dichos cambios se correlacionaron con la adquisición de tolerancia a deshidrataciones severas (**Figura i9**). Las plántulas de 3-4 semanas 35S:A9 resistieron pérdidas de hasta el 98 % de contenido inicial de agua, correspondientes a potenciales hídricos de hasta  $\phi = -40$  MPa (**Figura i9A**). Sin embargo, no se observó que la aclimatación al calor confiriese esta tolerancia a las plántulas no transgénicas. Tras ensayos de deshidratación severa DT2, aproximadamente el 40% de las plántulas 35S:A9 sobrevivieron a deshidrataciones correspondientes a potenciales hídricos cercanos a  $\phi = -20$  MPa, mientras que en las líneas no transgénicas sólo sobrevivieron menos del 5% de las plántulas. A deshidrataciones correspondientes a  $\phi = -30$  MPa, la supervivencia de las plántulas transgénicas se redujo al 15,6 %, llegando al 6,5 % de supervivencia a -40 MPa. Además, se observó como a  $\phi = -40$  MPa, en el 30 % de las plántulas transgénicas sobrevivía al menos una hoja, siendo este porcentaje superior al 22 % a  $\phi = -50$  MPa (**Figura i9B**; Prieto-Dapena *et al.*, 2008). Aunque en la mayoría de los casos la supervivencia de la hoja no fue suficiente para la recuperación del crecimiento normal de la plántula tras la deshidratación. Estos resultados indican que la tolerancia a la deshidratación severa mediada por el factor *HaHSFA9* es mayor en las hojas que en el resto de los órganos vegetativos. Esto nos ha llevado a centrar nuestra investigación en la posible protección de la maquinaria fotosintética frente a la deshidratación, en las plántulas 35S:A9.





**Figura i9.** Tolerancia a tratamientos de deshidratación severa DT2 de plántulas de tabaco con sobreexpresión ectópica del factor *HaHSFA9* (35S:A9). (A) Porcentaje de supervivencia de la plántula completa a distintos niveles de deshidratación, observado en plántulas de 3-4 semanas de 2 líneas transgénicas 35S:A9 (A9<sub>1</sub> y A9<sub>2</sub>) y sus líneas hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub> y NT<sub>2</sub>). (B) Porcentaje de plántulas con al menos una hoja viva, observado tras distintos niveles de deshidratación, en plántulas de 3-4 semanas de 2 líneas transgénicas 35S:A9 (A9<sub>1</sub> y A9<sub>2</sub>) y sus hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub> y NT<sub>2</sub>). Los niveles de deshidratación se expresan en potenciales hídricos ( $\Phi$ ; MPa). Adaptado de Prieto-Dapena *et al.* (2008).

Uno de los efectos de la deshidratación es el incremento de especies reactivas del oxígeno (ROS). Los ROS se generan principalmente en los cloroplastos y, de forma más limitada, en las mitocondrias (Bartels & Sunkar, 2005). Este estrés oxidativo causa daños críticos en los fotosistemas, principalmente en el PSII (Aro & Anderson, 1993; Nixon *et al.*, 2010). Antes de centrarnos de forma más detallada en los daños producidos por el estrés oxidativo en la maquinaria fotosintética, conviene repasar los aspectos más importantes de la fotosíntesis.

## 5. El aparato fotosintético en plantas.

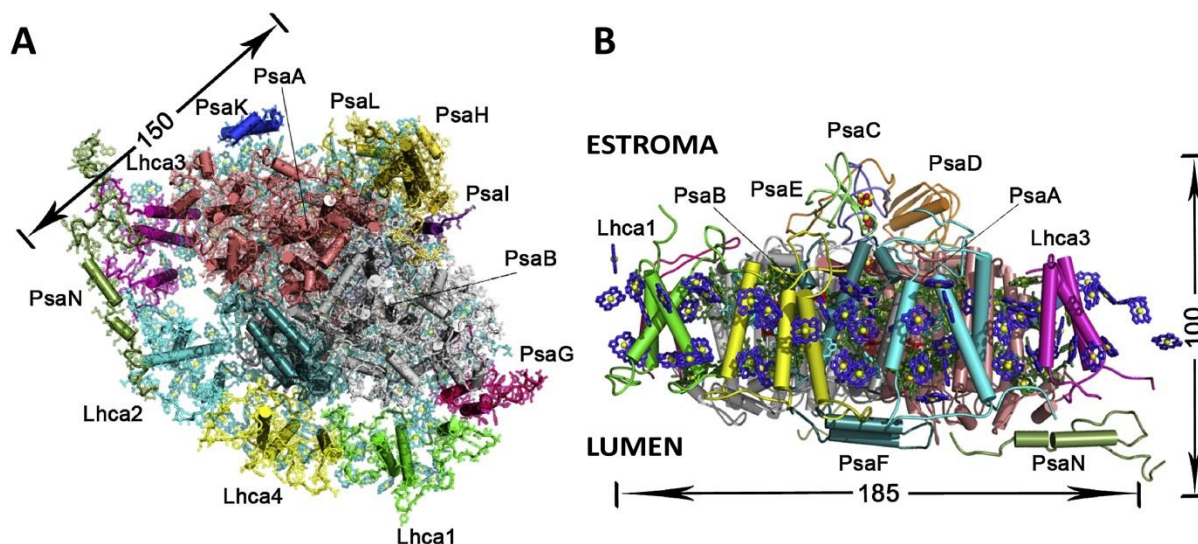
La fotosíntesis es el proceso biológico más importante de la tierra, mediante el cual se convierte energía solar en energía química. En eucariotas, este proceso tiene lugar en orgánulos

intracelulares especializados, los cloroplastos. La fotosíntesis en plantas y en cianobacterias produce directamente tanto ATP como NADPH mediante un proceso en dos pasos denominado fotofosforilación no cíclica. En este proceso, dos fotosistemas, denominados PSI y PSII, trabajan en serie y están funcionalmente acoplados por el complejo citocromo *b<sub>6</sub>f*, conformando la cadena de transferencia de electrones. Durante el proceso de transporte de electrones se genera un gradiente electroquímico de protones que impulsa la síntesis de ATP en el estroma, mediante la enzima ATP sintasa (Fromme & Grotjohann, 2008). Estos cuatro complejos proteicos que catalizan la transferencia de electrones y la transducción de energía fotosintética (PSI, PSII, citocromo *b<sub>6</sub>f* y ATP sintasa) se localizan en las membranas tilacoidales de los cloroplastos (Nelson & Yocum, 2006).

Las algas verdes y plantas superiores contienen complejos antena integrales de membrana, que sirven como sistemas antena periféricos de los fotosistemas, los complejos recolectores de luz LHCI y LHCII (*Light Harvesting Complexes I y II*). A diferencia de los sistemas antena integrales del PSI y el PSII, los cuales contienen sólo clorofila *a* (Chl *a*), los complejos LHCI y LHCII también contienen clorofila *b* (Chl *b*), lo cual permite que las plantas puedan absorber más luz del espectro visible (Fromme & Grotjohann, 2008). El LHCI funciona exclusivamente como antena periférica del PSI. Sin embargo, el LHCII puede moverse desde el PSII al PSI para equilibrar la captura de luz entre los fotosistemas en un proceso denominado estado de transición, que depende del estado redox de las plastoquinonas y el complejo citocromo *b<sub>6</sub>f* (Dekker & Boekema, 2008). Además, el LHCII juega un papel importante en la disipación del exceso de energía bajo condiciones de alta intensidad lumínica (Fromme & Grotjohann, 2008).

### ***Estructura y composición del Fotosistema I.***

Estructuralmente, el PSI de plantas consiste en dos complejos de membrana: el centro de reacción (RC), en el que tiene lugar la mayor parte de la captación de luz y la reacción de separación de cargas; y el complejo LHCI, que sirve como un sistema antena adicional que maximiza la recolección de radiación solar y transmite la energía al RC (Chitnis, 2001; Nelson & Yocum, 2006). El PSI de plantas está compuesto por 19 subunidades proteicas y aproximadamente 200 cofactores no proteicos, entre los que se encuentran 168 clorofilas, 5 carotenoides, 2 filoquinonas y 3 grupos 4Fe4S (Amunts *et al.*, 2008; Amunts & Nelson, 2009).



**Figura i10. Estructura del Fotosistema I.** Cada una de las 17 subunidades se representa mediante un color diferente. **(A)** Vista del PSI desde el lumen. Las clorofilas y los aminoácidos se muestran con transparencia. El complejo LHCI, compuesto por las proteínas de unión a clorofilas Lhca1-4, se ensambla alrededor del RC del PSI. La unión del LHCI y el RC es asimétrica, con mayor intensidad de unión en el polo PsaG que en el PsaK. La subunidad PsaH impide la trimerización del PSI. **(B)** Vista del PSI perpendicular a la membrana. Las clorofilas del LHCI aparecen en azul, y las clorofilas del RC aparecen en cian. Las subunidades PsaC, PsaD y PsaE forman el sitio de unión para la ferredoxina. La subunidad PsaF permite la unión de la plastocianina. La subunidad PsaN interacciona con Lhca2 y Lhca3. Adaptado de Amunts & Nelson (2009).

El RC del PSI está compuesto por 14 subunidades diferentes, denominadas PsaA-PsaP, de las cuales 12 están identificadas en su estructura (PsaA, PsaB, PsaC, PsaD, PsaE, PsaF, PsaG, PsaH, PsaI, PsaJ, PsaK y PsaL) (**Figura i10**). La posición de las subunidades PsaO y PsaP aún no ha sido identificada (Amunts & Nelson, 2008). Las funciones de las distintas subunidades están ampliamente estudiadas (Scheller *et al.*, 2001; Jensen *et al.*, 2003, 2007; Amunts & Nelson, 2008). Las dos subunidades de mayor tamaño, las proteínas homólogas PsaA y PsaB, forman un hetero-dímero consistente en 22 hélices transmembrana. La mayor parte de los cofactores de la cadena de transporte de electrones del PSI están asociados a las subunidades PsaA y PsaB. La parte estromal del dímero PsaA-PsaB está unida al grupo formado por las subunidades PsaC, PsaD y PsaE, que constituyen el sitio de unión de la ferredoxina, el aceptor de electrones. La subunidad estromal PsaC alberga los dos grupos 4Fe4S terminales de la cadena de transporte de electrones del PSI. La subunidad PsaF, localizada en la cara luminal, permite la unión de la plastocianina, y es esencial para la transferencia de energía desde el LHCI al RC. La subunidad PsaJ es importante para la estabilidad y ensamblaje del PSI. La subunidad PsaG, con dos hélices transmembrana, permite el anclaje de LHCI al PSI. En el lado opuesto del RC, las subunidades

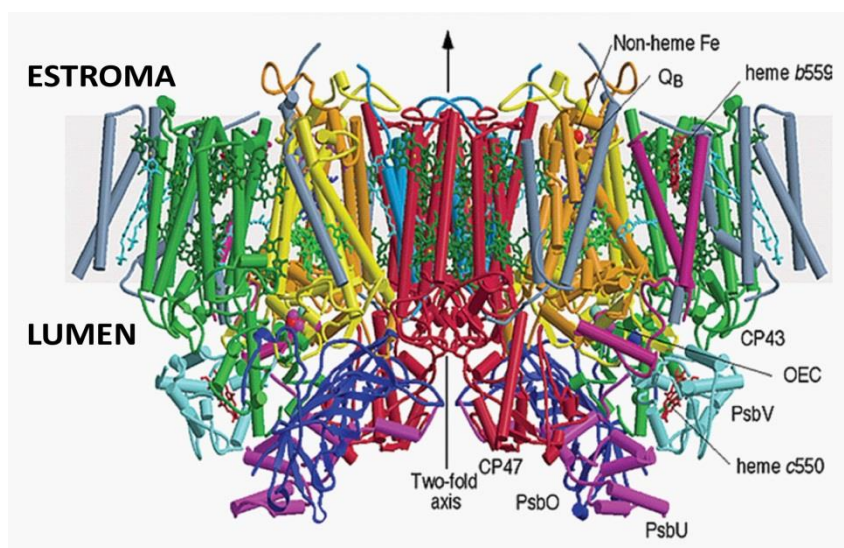
PsaH, PsaI, PsaL y PsaO componen el dominio de interacción con el LHCII. La función de PsaP se desconoce actualmente. La subunidad PsaN se ha identificado como una subunidad localizada exclusivamente en la cara luminal del PSI, aunque la función de PsaN no está clara (Amunts *et al.*, 2007; Amunts & Nelson, 2008).

El complejo LHCI está compuesto por productos de genes nucleares (Lhca1-Lhca4), ensamblados formando dos dímeros, unidos a clorofilas y carotenos, que se organizan alrededor del RC del PSI por la cara opuesta a la subunidad PsaH (**Figura i10**). Cada monómero del LHCI consiste en 3 hélices transmembrana, las cuales se unen a 14-15 moléculas de clorofila. La unión del LHCI al RC del PSI es asimétrica. La subunidad Lhca1 se une fuertemente al RC a través de la subunidad PsaG. Además, Lhca1 actúa como punto de anclaje para facilitar la unión de las otras subunidades del LHCI. Las otras subunidades del LHCI interaccionan con el RC mediante pequeñas uniones en la superficie de las regiones estromales expuestas. Lhca4 se une a PsaF y Lhca2 se asocia con PsaJ (Amunts *et al.*, 2008, Amunts & Nelson, 2009).

### **Estructura y composición del Fotosistema II.**

Un monómero del PSII está compuesto por 17 subunidades proteicas transmembrana y 3 proteínas extrínsecas, asociadas a 35 clorofilas, 11 carotenoides, 14 lípidos, 2 grupos hemo, 1 grupo férrico no-hemo, y un grupo  $Mn_4Ca$  (**Figura i11**). El núcleo del RC está compuesto por dos proteínas homólogas, denominadas D1 (psbA) y D2 (psbD), compuestas por cinco  $\alpha$ -hélices transmembrana. Estas proteínas se unen a cofactores que facilitan la separación primaria de cargas (Barber, 1987; Nixon *et al.*, 2005; Fromme & Grotjohann, 2008). Las proteínas D1 y D2 están asociadas con dos proteínas de unión a clorofilas CP (*Chlorophyll containing proteins*), denominadas CP43 (psbC) y CP47 (psbB). El RC del PSII de plantas y cianobacterias tiene una estructura dimérica (Barber, 2006). La subunidad CP47 se localiza cerca del dominio de dimerización, mientras que CP43 se localiza en la periferia del dímero formado por dos monómeros del PSII (Fromme & Grotjohann, 2008). Además, existen 13 subunidades de bajo peso molecular (PsbE, PsbF, PsbH, PsbI, PsbJ, PsbK, PsbL, PsbM, PsbTc, PsbX, PsbY, PsbZ y Ycf12), normalmente con una única  $\alpha$ -hélice transmembrana (salvo PsbZ, que posee 2  $\alpha$ -hélices transmembrana), de las cuales sólo se han caracterizado las subunidades PsbE y PsbF. Estas 2 subunidades proporcionan ligandos de histidina para el grupo hemo del citocromo  $b_{559}$  (Shen *et al.*, 2008). El RC del PSII tiene además 4 proteínas extrínsecas unidas a su cara luminal, cuya

naturaleza varía en función del tipo de organismo. En plantas y algas verdes, estas 4 proteínas extrínsecas, PsbO, PsbP, PsbQ y PsbR se unen a la región extra-membrana de las proteínas D1, D2, CP47 y CP43, y al grupo  $Mn_4Ca$  para constituir el complejo de escisión de oxígeno (OEC, *Oxygen-evolving complex*) (Allahverdiyeva *et al.*, 2013).



**Figura i11. Estructura dimérica del Fotosistema II.** Vista del PSII perpendicular a la membrana. Las  $\alpha$ -hélices se representan mediante cilindros. Las distintas subunidades se representan con distinto color: D1 (amarillo), D2 (naranja), CP47 (rojo), CP43 (verde), PsbL, PsbM y PsbT (azul intermedio), y PsbH, PsbI, PsbJ, PsbK, PsbX, PsbZ y PsbN en azul claro; las proteínas extrínsecas PsbO (azul oscuro), PsbU (magenta) y PsbV (cian). Las clorofilas del RC unidas al dímero D1/D2 aparecen en verde claro, las feofitinas en azul, las clorofilas de los complejos antena en verde oscuro, y los  $\beta$ -carotenos en naranja. Adaptado de Barber (2006).

En las membranas de las granas tilacoidales de plantas y algas verdes se han encontrado un número variable de proteínas de la superfamilia LHC (*Light Harvesting Complex*) asociadas a dímeros del PSII, formando los denominados supercomplejos PSII-LHCII (Dekker & Boekema, 2008). Estos sistemas periféricos de captación de luz consisten en cuatro miembros homólogos, denominados LHCII, CP29, CP26 y CP24. El complejo LHCII es el más abundante en los cloroplastos, mientras los otros 3 sistemas de captación son denominados proteínas de unión a clorofila (CP), debido a su baja abundancia. Cada monómero LHCII consiste en 3 hélices transmembrana, y puede unirse a 13-15 moléculas de Chl *a* y Chl *b* y 3-4 carotenoides (Fromme & Grotjohann, 2008; Liu & Chang, 2008). Generalmente, el complejo LHCII puede existir en forma de homo o hetero-trímeros en las membranas tilacoidales, formado por el producto de 3 genes nucleares homólogos, *Lhcb1*, *Lhcb2* y *Lhcb3*. Este estado trimérico mejora la estabilidad de

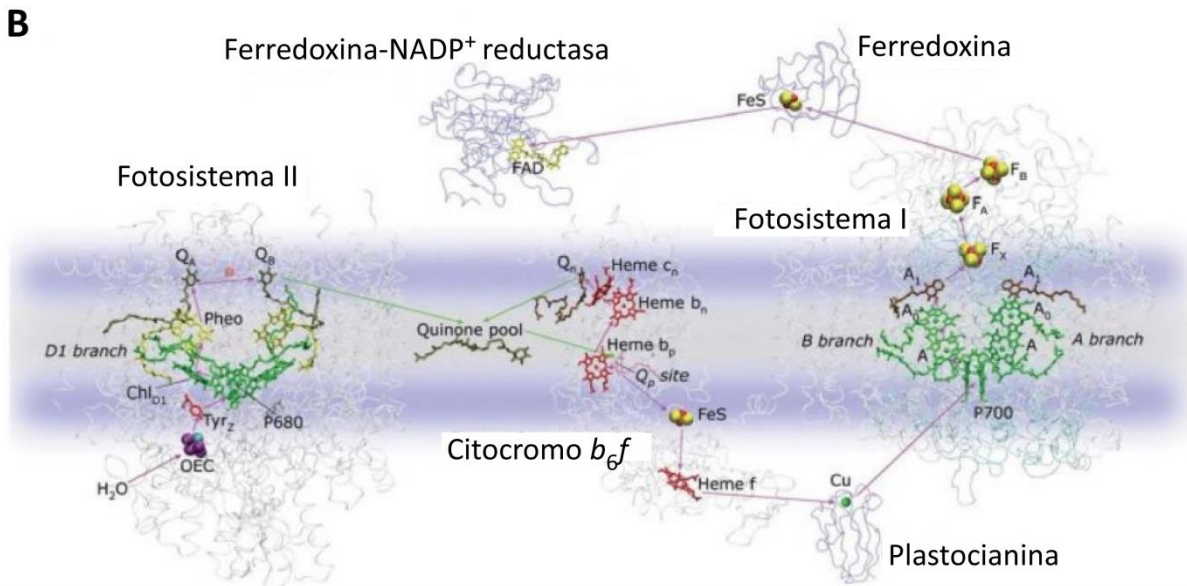
la proteína y la eficiencia de la captación de luz, y optimiza el control de la disipación de energía (Liu & Chang, 2008). Los tres complejos antena minoritarios CP29 (*Lhcb4*), CP26 (*Lhcb5*) y CP24 (*Lhcb6*) están presentes como monómeros, y unen al LHCII con el RC del PSII, formando los supercomplejos PSII-LHCII (Pan *et al.*, 2013).

### *La cadena de transporte de electrones.*

A continuación describiremos brevemente el flujo de electrones en la fotosíntesis, desde la separación de cargas y rotura de la molécula de agua hasta la formación de NADPH (**Figura i12**). Los electrones necesarios para las reacciones de transferencia electrónica son aportados por el PSII mediante la fragmentación de una molécula de agua. Cuando un fotón incide sobre las clorofilas P680 del RC, el donador primario del PSII, éstas se excitan y se produce la separación de cargas, perdiendo un electrón, que es transferido a través de la membrana. Las clorofilas P680 vuelven a su estado inicial aceptando un electrón del complejo OEC, a través de un dador electrónico inmediato, un residuo de Tyr (Tyr<sub>z</sub>) de la subunidad D1 del RC del PSII. El OEC contiene un grupo metálico formado por cuatro átomos de manganeso y un ion calcio. En cada evento de separación de carga, se extrae un electrón del grupo Mn<sub>4</sub>Ca. Tras cuatro separaciones de cargas consecutivas, el grupo Mn<sub>4</sub>Ca es capaz de quitar cuatro electrones a dos moléculas de agua, formándose una molécula de oxígeno. Durante el proceso, se liberan al lumen cuatro protones (H<sup>+</sup>), que contribuyen a la creación de un gradiente de protones entre ambos lados de la membrana (Fromme & Grotjohann, 2008; Shen *et al.*, 2008).

El electrón proveniente de las clorofilas P680 se transfiere a una clorofila accesoria (Chl<sub>D1</sub>), que lo cede a una feofitina (Pheo), y posteriormente a una filoquinona de unión fuerte (Q<sub>A</sub>), que lo cede a una filoquinona móvil (Q<sub>B</sub>). Tras dos eventos sucesivos de separación de cargas, Q<sub>B</sub> se encuentra totalmente reducida (PQH<sub>2</sub>) y abandona el PSII a través de un canal de membrana hasta el citocromo *b<sub>6</sub>f*. Un electrón se transfiere directamente al grupo 2Fe2S, que lo transfiere al citocromo *f*, localizado en un dominio extrínseco a la membrana luminal del complejo *b<sub>6</sub>f*. La subunidad citocromo *f* contiene un sitio de unión para la plastocianina, el cual transfiere el electrón al PSI. El segundo electrón sigue la vía cíclica (o ciclo Q). Tras completar este ciclo, el electrón se transfiere al grupo FeS para reducir una segunda molécula de plastocianina (Fromme & Grotjohann, 2008).





**Figura i12. La cadena de transporte de electrones fotosintética.** (A) Modelo estructural de los componentes proteicos de la cadena de transporte de electrones y la ATP sintasa en el orden en que aparecen en la cadena de transporte de electrones. (B) Componentes funcionales de la cadena de transporte de electrones. A través de las flechas puede seguirse la ruta que sigue el electrón a lo largo de la cadena. Las flechas moradas representan el transporte directo del electrón, mientras que las flechas verdes indican el transporte de un electrón junto a un protón, en forma de plastoquinona reducida. Para más detalles consultar el texto. Adaptado de Fromme & Grotjohann, (2008).

El PSI cataliza la transferencia electrónica desde la plastocianina, en la cara luminal de la membrana, hasta la ferredoxina, en la cara estromal. Cuando un fotón incide sobre las clorofilas P700, éstas se excitan y tiene lugar la separación de cargas. Las clorofilas P700 ceden un electrón a un aceptor primario ( $A_0$ ), una Chl  $a$ , y este aceptor lo cede a una molécula de filoquinona ( $A_1$ ) y tres grupos 4Fe4S ( $F_x$ ,  $F_A$  y  $F_B$ ). Finalmente, el electrón se transfiere desde el grupo  $F_B$  hasta la ferredoxina, una proteína ferro-sulfurada asociada débilmente a la cara estromal de la membrana tilacoidal. Dos ferredoxinas transfieren sus electrones a la ferredoxina:NADP<sup>+</sup>

reductasa (FNR) para la reducción de  $\text{NADP}^+$  hasta NADPH, el producto final de la cadena de transporte de electrones. Las clorofilas P700 vuelven a su estado original aceptando un electrón de la plastocianina (Fromme & Grotjohann, 2008; Krauss 2008).

## 6. El estrés oxidativo y el daño del aparato fotosintético.

En los cloroplastos, se generan continuamente ROS, principalmente por la transferencia directa de la energía de excitación desde la clorofila o por la reducción incompleta del oxígeno en el PSI. Estos ROS incluyen oxígenos moleculares singlete ( $^1\text{O}_2$ ), radicales aniónicos superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), radicales hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ) y peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). La toxicidad del  $\text{H}_2\text{O}_2$  no se debe a su reactividad *per se*, sino que requiere de la presencia de un metal redundante para formar un grupo hidroxilo altamente reactivo, el cual reacciona potencialmente con todas las moléculas biológicas. Así, los metales de transición, como los iones de hierro y cobre, pueden reaccionar con el  $\text{H}_2\text{O}_2$  por catálisis enzimática durante condiciones de estrés para producir radicales hidroxilos altamente reactivos (reacción de Fenton), los cuales oxidan proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. El aumento de la fotorrespiración y la actividad NADPH durante el estrés contribuyen al incremento en la acumulación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que inactiva enzimas por la oxidación de los *grupos tiol* (Bartels & Sunkar, 2005). *In vivo*, la amplitud del daño bajo cualquier tipo de estrés depende del equilibrio entre los procesos de daño y reparación. El aparato fotosintético es muy sensible a daños, y debe conservarse o repararse rápidamente tras un estrés. Se han descrito, al menos, tres puntos sensibles a estrés en la maquinaria fotosintética: los fotosistemas, principalmente el PSII, la síntesis de ATP, y los procesos de asimilación del carbono. Existen dos formas principales de deficiencia inducida por estrés en la fotosíntesis: el daño directo inducido por el factor estresante, y la inhibición de la síntesis de proteínas por los ROS. Estreses como la limitación de  $\text{CO}_2$ , deshidratación, frío o alta salinidad pueden catalogarse como estreses oxidativos que inhiben la reparación del PSII y/o del PSI (Allakhverdiev *et al.*, 2008).

El PSII es un sitio crítico de daño durante condiciones de estrés como deshidratación, calor, alta luminosidad, y luz UV-B (Allakhverdiev *et al.*, 2008). El estrés hídrico normalmente provoca el daño del complejo OEC y del RC del PSII (Georgieva *et al.*, 2009). Entre los componentes intrínsecos del PSII, la proteína D1 es particularmente vulnerable al daño producido por los ROS (Aro *et al.*, 1993. 2005; Nixon *et al.*, 2010). Cuando el OEC se daña, se interrumpe el suministro



de electrones desde el agua a las clorofilas P680 oxidadas. Bajo estas condiciones, la absorción de luz visible por las clorofilas y la transferencia de energía de excitación siguen ocurriendo, produciéndose una fuerte oxidación que daña a la proteína D1. Alternativamente, la disrupción del OEC permite el acceso de las moléculas de O<sub>2</sub> a las clorofilas P680, generándose ROS que pueden dañar el RC del PSII (Nishiyama *et al.*, 2011). Las proteínas extrínsecas y los cofactores parecen contrarrestan la acción negativa de los ROS sobre el PSII (Allakhverdiev *et al.*, 2008). Cuando las células fotosintéticas se exponen a la luz, tienen lugar dos fenómenos distintos, el daño sobre el PSII producido por la luz, y la reparación del PSII. Los organismos fotosintéticos son capaces de vencer el daño producido por la luz en el PSII mediante la rápida y eficiente reparación de los componentes dañados, lo cual requiere la síntesis *de novo* de proteínas. Cuando la tasa de daño del PSII se excede a la de reparación, la luz se convierte en un problema para la planta, en términos de capacidad fotosintética, produciéndose la fotoinhibición del PSII (Aro *et al.*, 1993; Nishiyama *et al.*, 2011). Numerosos estudios sugieren que las proteínas D2 y PsbH también sufren daños ocasionalmente por la luz. La reparación del daño en el PSII producido por la luz requiere la sustitución rápida de la proteína D1 dañada, mediante la síntesis *de novo* (Aro *et al.*, 2005; Nixon *et al.*, 2010). La síntesis *de novo* de proteína D1, así como de otras proteínas, se reprime por elevadas concentraciones intracelulares de ROS (Nishiyama *et al.*, 2011).

El PSI, en comparación con el PSII, se considera resistente a estrés (Sonoike, 2011). En particular, la desecación en oscuridad puede producir daños en el PSI de plantas normales, pero no en plantas de resurrección (Deng *et al.*, 2003; Georgieva *et al.*, 2009). Durante el proceso de fotoinhibición, disminuye la tasa de fotosíntesis como consecuencia del exceso de luz (Sonoike, 2011). Existen varios estudios que demuestran la fotoinhibición del PSI, aunque sólo un par de especies vegetales han mostrado fotoinhibición selectiva del PSI *in vivo*, con pequeños efectos en el PSII. Para muchas de las otras especies vegetales, el alcance de la fotoinhibición del PSI es igual o menor a la observada en el PSII. La fotoinhibición del PSI puede ser más peligrosa que la del PSII, debido a la lenta tasa de recuperación del PSI. La fotoinhibición del PSI no sólo es irreversible, sino que es la causa potencial de multitud de daños secundarios, por lo que parece lógico que el PSI esté bien protegido contra la fotoinhibición *in vivo* en muchas especies vegetales y bajo determinadas condiciones ambientales. Durante la fotoinhibición del PSI se produce la degradación de las subunidades del RC del PSI. Se ha descrito la fragmentación de las subunidades PsaA y PsaB, así como la fragmentación de otras subunidades pequeñas del PSI. La

tasa de reposición de subunidades del PSI no es tan alta como la observada para la proteína D1, por lo que la recuperación del PSI tras la fotoinhibición es muy lenta, en comparación con la recuperación del PSII. Además, la mayoría de los complejos RC del PSI fotoinhibido no se reparan, sino que se degradan tras la fotoinhibición junto con las clorofilas unidas a ellos (Sonoike, 2011).

EL PSII puede causar la fotoinhibición del PSI *in vivo*. El flujo de electrones desde el PSII es esencial para la fotoinhibición del PSI. Los electrones suministrados por el PSII reducen las moléculas de oxígeno en el sitio aceptor del PSI, resultando en la formación de radicales aniónicos superóxido y la reducción del grupo 4Fe4S que sirve como aceptor de electrones del PSI. El peróxido de hidrógeno producido por la dismutación de los radicales superóxidos, reaccionan con los centros Fe o FeS reducidos, produciendo radicales hidroxilo, que inmediatamente destruyen los centros 4Fe4S (Sonoike, 2011). Así, cualquier inhibición en la actividad del PSII puede proteger al PSI de la fotoinhibición. La fotoinhibición del PSII puede actuar como un mecanismo protector del PSI. La regulación negativa de la actividad del PSII puede ser esencial para la supervivencia bajo condiciones de estrés (Tikkanen *et al.*, 2014). Los ROS producidos en las clorofilas antenas pueden causar la fotoinhibición del PSI en ausencia de actividad del PSII (Sonoike, 2011).

Además, la fotoinhibición del PSI puede causar la fotoinhibición del PSII. Una vez que se induce la fotoinhibición del PSI, se bloquea la transferencia de electrones al PSI, produciéndose la sobre-reducción de las plastoquinonas en presencia de un PSII activo. Además, el bloqueo de la transferencia de electrones al PSI puede también causar el colapso de la síntesis de ATP. La síntesis de proteína D1 para la reparación del PSII, necesita el suministro continuo de energía. La disminución de la síntesis de ATP puede afectar a la reparación del PSII, provocando la fotoinhibición del PSII (Sonoike, 2011).

## 7. La senescencia en plantas.

La senescencia es un proceso de cambios degenerativos controlado endógenamente, que lleva a la muerte de un órgano o un organismo (Noodén, 2013). La senescencia de la hoja está regulada por factores endógenos, como el desarrollo reproductivo, hormonas y ROS, y por

factores ambientales, como estreses tanto abióticos como bióticos. El proceso de senescencia, al igual que otros tipos de muertes celulares programadas y la respuesta a estrés abiótico, está asociada con la sobreproducción de ROS, los cuales oxidan proteínas, lípidos y ADN, rompiendo la homeostasis celular y el balance entre las múltiples rutas que tienen lugar en los distintos compartimentos celulares, y provocando la peroxidación de lípidos, daños celulares, y finalmente la muerte celular (Khann-Chopra *et al.*, 2013). Sin embargo, aunque la senescencia puede desencadenarse a partir de señales exógenas, es un proceso activo controlado internamente, donde partes de un organismo controla a otras. Por ejemplo, las hojas jóvenes en crecimiento pueden causar la senescencia de hojas más viejas, o los frutos y semillas en proceso de maduración pueden inducir la senescencia de la planta completa. Así, existen diferentes patrones de senescencia, con diferentes funciones: de la hoja, de la flor, del fruto o la senescencia de plantas monocárpicas (Noodén, 2013).

La senescencia de la hoja causa generalmente una disminución programada de varios procesos celulares, incluida la fotosíntesis. Durante este proceso se incrementa la actividad proteolítica, acompañada por la remobilización de nutrientes dentro de la planta (Khann-Chopra *et al.*, 2013). Los cloroplastos contienen más del 50% del nitrógeno de la hoja, principalmente en forma de proteínas (Sabater & Martín, 2013). Hasta el 70% del nitrógeno de los cloroplastos se encuentra en la enzima Rubisco, aunque también existe gran cantidad de nitrógeno en los complejos LHC de las membranas tilacoidales. Durante la senescencia, los componentes del aparato fotosintético se degradan para reutilizar el nitrógeno en los nuevos órganos en formación (Krupinska *et al.*, 2013). En este proceso se moviliza el nitrógeno desde los órganos viejos hasta las estructuras jóvenes y en desarrollo, mediante su conversión en formas exportables, como asparagina o glutamina (Sabater & Martín, 2013). La degradación de las proteínas plastidiales durante la senescencia sigue diferentes rutas en la que participan proteasas plastidiales y sistemas proteolíticos extraplastidiales (Krupinska *et al.*, 2013).

La degradación de los cloroplastos es uno de los primeros eventos que tienen lugar durante la senescencia aunque se mantienen hasta las últimas etapas del proceso de senescencia, precediendo cambios morfológicos en el núcleo y las mitocondrias (Mulisch & Krupinska, 2013; Krupinska *et al.*, 2013). Durante la senescencia de la hoja, los cloroplastos se transforman en gerontoplastos, mediante cambios estructurales que afectan a la organización del sistema de membranas tilacoidales, las cuales son progresivamente degradadas. Debido a que la senescencia puede estar afectada por diversos factores ambientales, las plantas pueden usar

diferentes estrategias para dismantelar los cloroplastos (Mulisch & Krupinska, 2013). La desorganización estructural de los tilacoides se acompaña por una disminución en las reacciones fotoquímicas y en la eficiencia las enzimas del ciclo de Calvin-Benson, incluida la enzima Rubisco (Krupinska *et al.*, 2013).

Durante el proceso de senescencia, los cloroplastos están en situación de dilema. Por un lado, son necesarios para la producción de energía mediante la fotosíntesis, y al mismo tiempo deben ser degradados para la obtención de nutrientes. Para coordinar la fotosíntesis con el dismantelamiento de la organela es necesaria una elevada coordinación entre los plástidos y el núcleo (Krupinska *et al.*, 2013). Los ROS participan en la comunicación entre los cloroplastos y el núcleo, y juegan un papel importante en el desarrollo del proceso de senescencia. Muchos de los genes implicados en el desensamblaje de los cloroplastos y la senescencia de la hoja están localizados en el núcleo, aunque codifican proteínas con función en los cloroplastos o las vacuolas, en las cuales se completa el proceso de degradación, lo cual sugiere que la senescencia está controlada inicialmente a nivel nuclear (Sabater & Martín, 2013).

## Objetivos



El trabajo previo de nuestro laboratorio caracterizó un programa genético activado en semillas por factores HSF, que incluye la expresión de genes *hsp*, y en el cual juega un papel importante el factor *HaHSFA9*. La activación de este programa genético en tejidos vegetativos de plántulas de tabaco transgénicas, mediante la sobreexpresión ectópica de *HaHSFA9*, confirió fenotipos de tolerancia a deshidratación severa (Prieto-Dapena *et al.*, 2008). Bajo estas condiciones de deshidratación, se observó una clara protección de la parte aérea de la plántula, que sugiere la protección de la maquinaria fotosintética frente al daño producido por el estrés oxidativo generado durante la deshidratación. Esta tolerancia a condiciones tan drásticas de deshidratación nos hace suponer que el programa genético activado por *HaHSFA9* incluye la expresión de otros genes, distintos a los genes *hsp*. Por otro lado, se encontraron evidencias de que otros HSF de clase A deben participar junto a *HaHSFA9* en la activación de dicho programa genético (Tejedor-Cano *et al.*, 2010; Carranco *et al.*, 2010). Resultados recientes de nuestro laboratorio apuntan a que el factor *HaHSFA4a* podría ser uno de dichos factores (Tejedor-Cano *et al.*, 2014). En nuestro trabajo, nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

- A. Estudiar la posible protección del aparato fotosintético frente a estreses abióticos extremos mediada por el programa genético activado por *HaHSFA9*.
- B. Confirmar al factor *HaHSFA4a* como uno de los factores HSF de clase A que, junto a *HaHSFA9*, activan el programa genético implicado en la protección frente a estreses abióticos extremos.
- C. Identificar otros genes pertenecientes al programa genético activado por el factor *HaHSFA9*.





## Materiales y métodos



## 1. Material biológico.

### 1.1. Plantas transgénicas de tabaco.

En este trabajo, hemos utilizado diferentes líneas transgénicas de tabaco, obtenidas a partir de plantas de tabaco silvestre (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) o a partir de plantas de tabaco transgénicas 35S:A9.

#### 1.1.1. Plántulas transgénicas.

En todos nuestros ensayos, salvo cuando se indica lo contrario, se emplearon plántulas transgénicas de tabaco de 3-4 semanas tras la germinación, cultivadas *in vitro* (ver **Sección 1.1.3.**). Estas plántulas transgénicas sobreexpresan ectópicamente el correspondiente factor HSF bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S (*Cauliflower mosaic virus*).

#### Líneas 35S:A9.

Las plántulas transgénicas 35S:A9, descritas por Prieto-Dapena *et al.* (2008), sobreexpresan ectópicamente el factor *HaHSFA9* bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S. Las 3 líneas 35S:A9 usadas, presentan diferentes eventos de integración simple del transgén *35S:HaHSFA9* en homocigosis: A9<sub>1</sub> (35S:A9 #2-18); A9<sub>2</sub> (35S:A9 #17-8) y A9<sub>3</sub> (35S:A9 #12-4). Las correspondientes líneas hermanas no transgénicas se obtuvieron mediante segregación: NT<sub>1</sub> (35S:A9 #2-6); NT<sub>2</sub> (35S:A9 #17-6) y NT<sub>3</sub> (35S:A9 #12-1).

Para la obtención de las líneas 35S:A9/A4a mediante transformación con *A. tumefaciens*, se utilizaron discos de hojas obtenidos a partir de brotes de tabaco de las líneas 35S:A9 (ver **Sección 4.2.**).

### *Líneas 35S:A4a.*

Las plántulas transgénicas 35S:A4a sobreexpresan ectópicamente el factor *HaHSFA4a* bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S. Estas líneas se obtuvieron por transformación a partir de plantas de tabaco silvestre (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi), tal como se detalla en la **Sección 4**. Las 3 líneas 35S:A4a usadas, presentan diferentes eventos de integración simple del transgén *35S:HaHSFA4a* en homocigosis: A4a<sub>1</sub> (35S:A4a<sub>1</sub>), A4a<sub>2</sub> (35S:A4a<sub>2</sub>) y A4a<sub>3</sub> (35S:A4a<sub>3</sub>). Las correspondientes líneas hermanas no transgénicas se obtuvieron mediante segregación: NT<sub>1</sub>, NT<sub>2</sub> y NT<sub>3</sub>.

### *Líneas 35S:A9/A4a.*

Las plántulas dobles transgénicas 35S:A9/A4a sobreexpresan ectópicamente los factores *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* bajo el control del promotor constitutivo CaMV 35S. Estas líneas se obtuvieron por transformación a partir de plantas transgénicas de tabaco de las líneas 35S:A9, tal como se detalla en la **Sección 4**. Las 4 líneas 35S:A9/A4a usadas, presentan diferentes eventos de integración simple del transgén *35S:HaHSFA4a* en homocigosis, integrados en 3 fondos genéticos 35S:A9 diferentes: A9<sub>1</sub>/A4a<sub>1</sub> (35S:A9<sub>1</sub>/A4a<sub>1</sub>), A9<sub>1</sub>/A4a<sub>2</sub> (35S:A9<sub>1</sub>/A4a<sub>2</sub>), A9<sub>2</sub>/A4a (35S:A9<sub>2</sub>/A4a) y A9<sub>3</sub>/A4a (35S:A9<sub>3</sub>/A4a). Las correspondientes líneas hermanas transgénicas simples se obtuvieron mediante segregación: A9<sub>1</sub>, A9<sub>2</sub> y A9<sub>3</sub>.

### **1.1.2. Semillas transgénicas.**

Para el estudio de la inducción de la acumulación de proteínas sHSP-P mediado por el programa genético activado por el factor HSFA9 (ver **Figuras r2 y r3**) se emplearon semillas transgénicas maduras de tabaco. Estas semillas transgénicas expresan en correspondiente factor HSF bajo el control del promotor específico de semillas *HaDS10G1* (Rousselin *et al.*, 2002).

### *Líneas DS10:A9*

Las semillas transgénicas DS10:A9, descritas por Prieto-Dapena *et al.* (2006), sobreexpresan el factor *HaHSFA9* bajo el control del promotor específico de semillas *HaDS10G1*. Las 4 líneas DS10:A9 usadas, presentan diferentes eventos de integración simple del transgén *DS10:HaHSFA9* en homocigosis: A9<sub>1</sub> (DS10:A9 #6-7); A9<sub>2</sub> (DS10:A9 #14-5) y A9<sub>3</sub> (DS10:A9 #19-4) y

A9<sub>4</sub> (DS10:A9 #22-11). Las correspondientes líneas hermanas no transgénicas se obtuvieron mediante segregación: NT<sub>1</sub> (DS10:A9 #6-5); NT<sub>2</sub> (DS10:A9 #14-6); NT<sub>3</sub> (DS10:A9 #19-10) y NT<sub>4</sub> (DS10:A9 #22-7).

### **Líneas DS10:A9M3**

Las semillas transgénicas DS10:A9M3, descritas por Tejedor-Cano *et al.* (2010), sobreexpresan una forma represora activa de *HaHSFA9* (A9M3) bajo el control del promotor específico de semillas *HaDS10G1*. Las 4 líneas DS10:A9M3 usadas, presentan diferentes eventos de integración simple del transgén DS10:A9M3 en homocigosis: A9M3<sub>1</sub> (DS10:A9M3 #5 T); A9M3<sub>2</sub> (DS10:A9M3 #9 T); A9M3<sub>3</sub> (DS10:A9M3 #30 T) y A9M3<sub>4</sub> (DS10:A9M3 #34 T). Las correspondientes líneas hermanas no transgénicas se obtuvieron mediante segregación: NT<sub>1</sub> (DS10:A9M3 #5 NT); NT<sub>2</sub> (DS10:A9M3 #9 NT); NT<sub>3</sub> (DS10:A9M3 #30 NT) y NT<sub>4</sub> (DS10:A9M3 #34 NT).

#### **1.1.3. Cultivo *in vitro*.**

El cultivo *in vitro* de las plantas se empleó principalmente para la propagación de las diferentes líneas transgénicas de tabaco, dirigida a la obtención de plántulas de 3-4 semanas tras la germinación, que posteriormente fueron usadas en los respectivos ensayos experimentales. Además, también se empleó el cultivo *in vitro* para la obtención de las líneas transgénicas 35S:A4a y dobles transgénicas 35S:A9/A4a: en los sucesivos pasos de transformación de las plantas mediante *A. tumefaciens*, selección de transformantes positivos, propagación vegetativa y regeneración de la planta, y obtención de las correspondientes líneas hermanas singénicas, y para el estudio de segregación (ver **Sección 4.**).

#### **Esterilización de la semilla y cultivo *in vitro*.**

Antes de la germinación, la superficie de las semillas de tabaco se esterilizó con 5 % hipoclorito sódico (p/v) durante 20 min, seguido por 4 lavados con agua destilada estéril. Las semillas esterilizadas se sembraron en placas Petri (9 cm de diámetro) con medio sólido MS (Murashige & Skoog, 1962). Para la obtención de las plántulas de 3-4 semanas usadas en los

ensayos experimentales, las semillas se sembraron en el **medio MS**, sobre papel de filtro ( $50 \text{ g m}^{-2}$ ) esterilizado mediante autoclave.

Durante el proceso de obtención de las plantas transgénicas 35S:A4a y 35S:A9/A4a, el medio sólido MS, en placas Petri o en contenedores *Magenta<sup>TM</sup>* (*Sigma-Aldrich*), se suplementó con diferentes hormonas y antibióticos, tal como se detalla en el correspondiente apartado de la **Sección 5**.

**Medio MS:** 4,4 g/l MS (*Duchefa Biochemie*) 30 g/l sacarosa, pH 5,8.

Para la preparación de medio sólido se añadió 8 g/l *Plant Agar* (*Duchefa Biochemie*).

Las placas Petri con las semillas, se incubaron en cámaras de cultivo con iluminación y temperatura controladas: 16 h de luz, a  $25^{\circ}\text{C}$ , y 8 h de oscuridad, a  $20^{\circ}\text{C}$ ; y una intensidad de luz de  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### Manipulación del material vegetal

La manipulación del material vegetal se realizó en condiciones de esterilidad, en una cabina de flujo laminar. Los medios de cultivo, el material de vidrio y las distintas soluciones empleadas se esterizaron mediante autoclave a  $120^{\circ}\text{C}$  y 1 atmósfera de sobrepresión durante 20 min. Los antibióticos se añadieron al medio de cultivo una vez enfriado a  $50\text{-}55^{\circ}\text{C}$ . Los útiles empleados para la manipulación del material vegetal se esterizaron por calor.

#### 1.1.4. Cultivo en tierra.

Para la obtención de semillas, las plantas de tabaco se cultivaron en tierra, en cámaras con luz, temperatura y humedad controladas. Las plantas se cultivaron en macetas en una mezcla 4:1 de turba y perlita. Se sometieron a un régimen de 16 h de luz a  $25^{\circ}\text{C}$  y 8 h de oscuridad a  $20^{\circ}\text{C}$ , con una humedad relativa constante del 80 %.

## 1.2. Bacterias.

### 1.2.1. *Escherichia coli*.

En este trabajo, hemos utilizado células competentes de *E. coli* XL1-BLUE, con genotipo *recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17 supE44 relA1 lac* {F' *proAB lacI<sup>q</sup> ZDM15Tn10* (tetR)} (Bullock *et al.*, 1987). Esta estirpe se usó para la transformación y la propagación de plásmidos. Las bacterias se cultivaron en **medio LB** o **YEP** a 37 °C. Para la selección de bacterias portadoras de plásmidos, el medio se suplementó con 50 µg/ml de ampicilina o 50 µg/ml de kanamicina.

**Medio LB:** 10 g/l bactotripton, 5 g/l extracto de levadura y 10 g/l NaCl pH 7,0.

**Medio YEP:** 10 g/l bactotripton, 10 g/l extracto de levadura y 5 g/l NaCl pH 7,0.

Para preparar medio sólido se añadieron 15 g/l de agar bacteriológico.

### 1.2.2. *Agrobacterium tumefaciens*.

En este trabajo, hemos utilizado células competentes de *A. tumefaciens* LBA4404. Esta estirpe llevaba el plásmido Cr (críptico) pAL4404 en el fondo cromosómico C58-C9 (Hoekema *et al.*, 1983). La estirpe de *A. tumefaciens* LBA4404 se ha empleado para la transformación de discos de hojas de tabaco, para la obtención de plantas transgénicas (ver **Sección 4.**). Esta estirpe se cultivó a 28 °C en **medio YEP** suplementado con 50 µg/ml de estreptomicina. Las bacterias transformantes se seleccionaron en **medio YEP** suplementado con 50 µg/ml de kanamicina.

## 2. Análisis y tratamientos de ADN.

### 2.1. Purificación de ADN plasmídico.

Para la extracción de ADN plasmídico se empleó el Kit *NucleoSpin® Plasmid* (Macherey-Nagel), siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante.

### 2.2. Cuantificación de ADN.

La concentración de DNA se cuantificó mediante un espectrofotómetro *NanoDrop® ND-1000* (Thermo Fisher Scientific Inc.). Para verificar la concentración de ADN, la muestra se comparó con muestras de ADN de concentración conocida, por electroforesis en gel de agarosa.

### 2.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Para la electroforesis de ADN se usaron geles 1-1,6 % agarosa (p/v) en **tampón TBE**. La electroforesis se realizó a 70-100 V, usando como tampón de corrida **tampón TAE** suplementado con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio.

**Tampón TBE:** 89 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,3.

### 2.4. Extracción de fragmentos de ADN de geles de agarosa.

Para la extracción de ADN de geles de agarosa se utilizó el kit *NucleoSpin® Extract II* (Macherey-Nagel) siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante.

### 2.5. Reacciones enzimáticas de ADN.

En general se han seguido los protocolos descritos por Sambrook *et al.* (1989).

#### 2.5.1. Digestión de ADN con enzimas de restricción.

Las digestiones de ADN con enzimas de restricción se realizaron usando los tampones y las condiciones recomendadas por el fabricante. Para 1 µg de ADN se usó, al menos, 1 U de enzima de restricción.

Para las subsecuentes manipulaciones, el ADN producto de la digestión se separó por electroforesis (ver **Sección 2.3.**) y el fragmento de ADN de interés se aisló mediante el kit descrito en la **Sección 2.4.**



### 2.5.2. Ligación de fragmentos de ADN.

Para la ligación de los fragmentos de ADN se usó la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (Invitrogen), siguiendo las indicaciones descrita por el fabricante. Para la ligación de ADN con extremos romos, la incubación se realizó a 14 °C durante toda la noche, y para la ligación de extremos cohesivos, la incubación se hizo a temperatura ambiente durante 1-2 h.

El producto de la ligación se usó para la transformación de bacterias (ver **Sección 3.**).

### 2.5.3. Reacción de secuenciación.

La secuenciación del ADN se realizó a través del Servicio *Secugen* (Madrid, España). Para cada reacción de secuenciación, se usaron 15 µl de ADN a una concentración 10 ng/µl. Los oligonucleótidos específicos se usaron a una concentración de 5 µM.

## 3. Transformación de bacterias.

El último paso en la clonación de plásmidos consistió en la transformación de un cultivo de células bacterianas con la mezcla resultante de la ligación (ver **Sección 2.5.2.**). De esta forma se clonaron plásmidos individuales, que posteriormente fueron analizados y seleccionados.

La introducción de ADN en bacterias requiere un tratamiento previo para hacer competentes a la célula bacteriana. Posteriormente, las células competentes se ponen en contacto con la solución de plásmidos, y las células transformantes se seleccionan en el medio apropiado.

### 3.1. Transformación de *Escherichia coli*.

Para la transformación de *Escherichia coli* XL1-Blue, se siguieron principalmente los protocolos descritos por Inoue *et al.* (1990) para la obtención de células competentes por el método de baja temperatura, y posterior transformación. Las células competentes se congelaron en N<sub>2</sub> líquido en alícuotas de 100 µl, y se guardaron a -80 °C hasta su uso. Para la transformación,

se usaron 10 ng de ADN, en un volumen menor a 20  $\mu$ l. Para la transformación de las células competentes, volúmenes descritos por Inoue *et al.* (1990) se ajustaron para un volumen inicial de 10  $\mu$ l de células competentes.

Tras la transformación, se seleccionaron las células transformadas en **medio LB** suplementado con el correspondiente antibiótico de selección del plásmido: 50  $\mu$ g/ml de ampicilina o 50  $\mu$ g/ml de kanamicina. Las células se incubaron durante toda la noche a 37 °C.

### Selección de transformantes mediante actividad $\beta$ -galactosidasa.

Esta técnica se basa el viraje de color, de blanco a azul, de las colonias que expresan el gen *lacZ*. Este gen codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa, la cual hidroliza X-gal, generando 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-índigo, un compuesto de color azul. El vector *pGEM<sup>®</sup>-T Easy* (Promega), usado en la transformación del ADN resultante de la hibridación sustractiva (ver **Sección 6.2.**) tiene la región *polylinker* dentro del gen *lacZ*. De modo que la inserción de un fragmento de ADN en el *polylinker* impide la expresión del gen. Este hecho nos permite diferenciar, en presencia de X-Gal e IPTG (un inductor de la  $\beta$ -galactosidasa) las colonias que contienen un vector con inserto y las que contienen un vector vacío, las cuales presentaran un color azulado.

Para la selección de las colonias que han incorporado el vector con inserto, las colonias se sembraron en placas Petri con **medio LB** suplementado con 50  $\mu$ g/ml ampicilina, sobre el que se extendieron 40  $\mu$ l de X-gal (20 mg/ml) y 4  $\mu$ l de IPTG (200 mg/ml). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se seleccionaron las colonias positivas (colonias blancas).

### 3.2. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*.

Para la preparación de células competentes de *A. tumefaciens* LBA4404, se siguió el protocolo descrito por Holsters *et al.* (1978). Finalmente, las células se congelaron en N<sub>2</sub> líquido en alícuotas de 100  $\mu$ l, y se guardaron a -80 °C hasta su uso.

Para la transformación, se añadió 1  $\mu$ g de ADN plasmídico, en un volumen menor a 10  $\mu$ l, a 100  $\mu$ l de células competentes *A. tumefaciens* LBA4404, y se congeló en N<sub>2</sub> líquido. A continuación, se descongelaron a 37 °C durante 5 min, se añadió 1ml de **medio YEP**, y se incubó a 28 °C con agitación suave durante 3 h.

Tras la transformación, se seleccionaron las células transformadas en **medio YEP** suplementado con antibióticos: 50 µg/ml de estreptomicina (para la selección de células de *A. tumefaciens*) y 50 µg/ml de kanamicina (para la selección del plásmido). Las células se incubaron a 28 °C durante 2-3 días.

#### 4. Obtención de plantas transgénicas de tabaco.

Para la obtención de las plantas transgénicas de tabaco 35S:A4a y dobles transgénicas 35S:A9/A4a (ver **Sección 1.1.1.**), se insertó el transgén *35S:HaHSFA4a* en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) silvestres o transgénicas 35S:A9, respectivamente, por transformación con *A. tumefaciens*.

Para ello, se transformó *A. tumefaciens* con el vector binario 35S:A4a, y se infectaron con estas células discos de hoja de plantas de tabaco, para la integración del transgén *35S:HaHSFA4a* dentro del ADN genómico de la planta. Posteriormente, los discos de hoja se trataron con hormonas de crecimiento y antibióticos, para la obtención de plantas transgénicas completas. Se seleccionaron aquellas que poseían una única integración del transgén, y a partir de éstas, se obtuvieron las correspondientes líneas transgénicas homocigóticas para el transgén *35S:HaHSFA4a*, así como sus respectivas hermanas singénicas.

##### 4.1. Construcción del vector binario 35S:A4a.

Para la construcción del vector binario 35S:A4a, se integró una fusión transcripcional del gen *HaHSFA4a* unida al tag 3xHA dentro del vector binario pBIB-Hyg (Becker, 1990):

El ADN de *HaHSFA4a* se obtuvo mediante amplificación por PCR a partir del vector binario pBI221:*HaHSFA4a* (Tejedor-Cano *et al.*, 2014). Para la reacción de PCR se usó la enzima de alta fidelidad *Pwo DNA Polimerase* (Roche), siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante. En este paso, se introdujeron un sitio de restricción *XbaI* (localizado 3 pb antes del codón ATG de inicio de la traducción) y un sitio *SaII* (localizado 5pb detrás del codón de *STOP*), mediante los oligonucleótidos 5'-GTTGTTGGTATATCTAGATCAATGATGAATGATGTTTCATGG-3' y 5'-GTAAATTGACAGTCGACCATATCAACTTCTCTCTA-CTG-3' (con una  $T_m$  de 67 °C).

El ADN amplificado (1215 pb) se digirió con las enzimas de restricción *Xba*I y *Sal*I (ver **Sección 2.5.**), y el fragmento resultante (1178 pb) se insertó en el vector pUC19-35S:HA, entre los sitios de restricción *Xba*I y *Sal*I del (Tejedor-Cano *et al.*, 2010), generándose el vector pUC-35S:3xHA:HaHSFA4a. Este paso permitió la inserción del gen *HaHSFA4a* entre la región promotora CaMV 35S y la etiqueta 3-HA (Hemaglutinina), fusionada en el N-terminal del gen, en el mismo marco de lectura.

El vector 35S:3xHA:HaHSFA4a se digirió con las enzimas de restricción *Hind*III y *Kpn*I, y el fragmento resultante (2284 pb) se insertó entre los sitios de restricción *Hind*III y *Kpn*I del vector binario pBIB-Hyg (Becker, 1990), obteniéndose el vector binario 35S:A4a.

### 4.2. Transformación de discos de hoja de tabaco.

Para la transformación de plantas de tabaco con *A. tumefaciens* se siguió principalmente el protocolo descrito por Horsch *et al.* (1985).

La cepa de *A. tumefaciens* portadora del vector binario 35S:A4a (ver **Sección 3.2.**) se sembraron en césped en placas Petri con **medio YEP** (ver **Sección 1.2.1.**) suplementado con 50 µg/ml de kanamicina y 50 µg/ml de estreptomicina, y se cultivaron a 28 °C durante 48 h. Posteriormente, las células resuspendieron en **medio MS** (ver **sección 1.1.3.**) suplementado con hormonas de crecimiento (0,1 mg/l NAA y 1 mg/l 6BA).

Para la transformación con *A. tumefaciens*, se usaron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi), silvestres o transgénicas 35S:A9, cultivadas *in vitro* en contenedores Magenta (Sigma), en condiciones de esterilidad. Se seleccionaron hojas totalmente expandidas de plantas jóvenes (5-6 semanas) y se cortaron en trozos de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>, eliminando el nervio central. Los discos de hojas se sumergieron en el cultivo de *A. tumefaciens* en **medio MS** durante 5 min. Posteriormente, los discos de hoja se colocaron, con el haz hacia arriba, en placas Petri con **medio MS** suplementado con hormonas de crecimiento y se incubaron en cámaras de cultivo *in vitro*, con luz tenue. Transcurridos 5 días de incubación, los discos de hoja se traspararon a **medio MS** con las hormonas de crecimiento y antibióticos: 250 µg/ml de cefotaxina (para eliminar *A. tumefaciens*) y 45 µg/ml de higromicina (para seleccionar brotes transgénicos). Transcurridos 15-20 días de cultivo *in vitro*, empezaron a formarse callos, en los discos de hoja, a partir de los cuales proliferaron los brotes de plantas transgénicas.

### 4.3. Selección de transformantes y enraizamiento.

Los brotes obtenidos de los discos de hoja se separaron del callo y se traspasaron a contenedores *Magenta*<sup>TM</sup> (Sigma-Alrich) con **medio MS** suplementado con hormonas de crecimiento (0,1 mg/l NAA y 1 mg/l 6BA) y antibióticos (45 µg/ml higromicina y 250 µg/ml cefotaxina). En este medio, se seleccionaron los transformantes positivos, los cuales fueron capaces de enraizar en el medio suplementado con higromicina.

Las plantas se mantuvieron en cultivo *in vitro* hasta que alcanzaron una altura de 5-8cm. Posteriormente, se traspasaron a macetas con tierra (ver **Sección 1.1.4.**). Para aclimatarlas al cambio de humedad las plantas se cubrieron con bolsas de plástico durante unos días.

### 4.4. Obtención de plantas transgénicas homocigóticas.

Las plantas transgénicas obtenidas tras la transformación, se cultivaron en tierra hasta la obtención de semillas, y se seleccionaron las plantas que presentaban una integración simple del transgén *35S:HaHSFA4a*. Para ello, las semillas se sembraron en medio MS suplementado con 45 µg/ml higromicina, y se seleccionaron las líneas que presentaban una segregación mendeliana 3:1 para el transgén (aproximadamente 1 de cada 4 plantas no sobrevivía en presencia de higromicina).

Una vez seleccionadas las líneas con integración simple del transgén, se seleccionaron aquellas líneas que mejor expresaban el transgén *35S:HaHSFA4a* en heterocigosis. Se analizó la acumulación del *tag* HA en estas líneas por *western blot* tras electroforesis desnaturizante SDS-PAGE (ver **Sección 8.**), y se seleccionaron las líneas con mayor acumulación del *tag*.

A partir de estas líneas, obtuvimos líneas homocigóticas para el transgén *35S:HaHSFA4a*. Las plantas de las líneas heterocigóticas se cultivaron en tierra hasta la obtención de semillas. Posteriormente, se seleccionaron las plantas cuyas semillas presentaban un 100 % de supervivencia en presencia de higromicina. Finalmente, se seleccionaron las líneas transgénicas que mejor expresaban el transgén *35S:HaHSFA4a* en homocigosis. Se analizó la acumulación del *tag* HA en las plántulas por *western blot* tras electroforesis desnaturizante SDS-PAGE (ver **Sección 8.**), y se seleccionaron las líneas con mayor acumulación del *tag*.

### 5. Análisis y tratamientos de ARN.

En este trabajo, hemos empleado muestras de ARN de plántulas de tabaco para la obtención de una genoteca por hibridación sustractiva (ver **Sección 6.**) y para el análisis transcripcional por RT-qPCR (ver **Sección 7.**).

#### 5.1. Extracción de ARN vegetal.

Para la extracción de ARN a partir de plántulas de tabaco de 3-4 semanas, se usó el reactivo *Concert<sup>TM</sup> Plant RNA Reagent (Invitrogen)*, siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante. Durante la manipulación del ARN, intentamos evitar la contaminación con ARNasas. Para ello, todas las soluciones usadas se suplementaron con 0,1 % DEPC (v/v), y el material de plástico se esterilizó mediante dos ciclos de autoclave.

#### 5.2. Cuantificación de ARN.

La concentración de ARN se cuantificó mediante un espectrofotómetro *NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.)*. Además, los ARN se corrieron en un gel de electroforesis de agarosa con formaldehído para comprobar la calidad del ARN purificado, comparando las intensidades de las distintas bandas que componen la muestra de ARN.

#### 5.3. Electroforesis desnaturizante de ARN.

El análisis de ARN por electroforesis se realizó en geles de agarosa con formaldehído, según fue descrito por Sambrook *et al.* (1989). Los geles contuvieron 1,25 % agarosa (p/v) y 0,82 M formaldehído, en **tampón MOPS**, (añadido a la solución después de enfriarla a 50-60 °C tras fundir la agarosa). La electroforesis se realizó a 70-100V, usando como tampón de corrida **tampón MOPS**.

**Tampón MOPS:** 20 mM MOPS, 8 mM acetato sódico, 1 mM EDTA, pH 8,0.

Tras la electroforesis, el gel se fotografió con un sistema *ChemIDoc<sup>TM</sup> XRS Gel (Bio-Rad)*.

#### 5.4. Purificación de ARN.

Tras la extracción, las muestras de ARN se purificaron mediante el kit *RNeasy® Plant Mini* (Qiagen), siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante.

#### 5.5. Síntesis de ADNc.

Una vez purificado el ARN, procedimos a la síntesis de ADNc a partir del ARNm. La síntesis de ADNc de cadena doble, se hizo mediante el kit *SMARTer™ PCR cDNA Synthesis* (Clontech), y la polimerasa *50X Advantage 2 Polymerase Mix* (Clontech). La síntesis de ADNc se hizo según las indicaciones descritas por el fabricante, usando el protocolo específico de síntesis de ADNc para sustracción por PCR, el cual incluye una purificación del ADNc sintetizado, mediante cromatografía de exclusión. La síntesis de ADNc a partir de ARNm se dividió principalmente en dos pasos: en el primer paso, se generó ADNc de cadena simple a partir del ARNm, mediante el uso de cebadores específicos que hibridan con la región *poliA* del ARNm; en el segundo paso, se sintetizó la hebra complementaria del ADNc de cadena simple, obteniendo ADNc de cadena doble. Finalmente, el ADNc sintetizado se purificó por cromatografía en columna *CHROMA-SPIN* (Clontech), incluida en el kit de síntesis de ADNc.

### 6. Obtención de la genoteca por hibridación sustractiva.

La hibridación sustractiva permite la comparación de dos poblaciones de ARNm, obteniendo clones de los genes que se expresan en una población pero no la otra. Para ello, las dos poblaciones de ARNm se transforman en ADNc. Denominamos al ADNc que contiene transcritos específicos como *tester*, y al ADNc de referencia como *driver*. Los ADNc *tester* y *driver* se hibridan, y las secuencias hibridadas se eliminan. De esta forma se seleccionan los ADNc no hibridados, que representan a los transcritos que abundan en el *tester* pero no en el *driver*.

Esta técnica fue usada en nuestro trabajo para la obtención de una genoteca enriquecida en los genes que se inducían en las plántulas transgénicas 35S:A9, con respecto a las plántulas no transgénicas. Para ello, sintetizamos ADNc a partir de los ARNm de plántulas de 3-4 semanas correspondientes a una línea homocigótica 35S:A9 (A9<sub>1</sub>) y su correspondiente línea hermana NT

(NT<sub>1</sub>) (ver **Sección 5.5**), crecidas bajo condiciones normales de cultivo *in vitro*. La hibridación sustractiva se realizó usando como *tester* el ADNc de las plántulas 35S:A9, y como *driver* el ADNc de las plántulas NT.

### 6.1. Hibridación sustractiva.

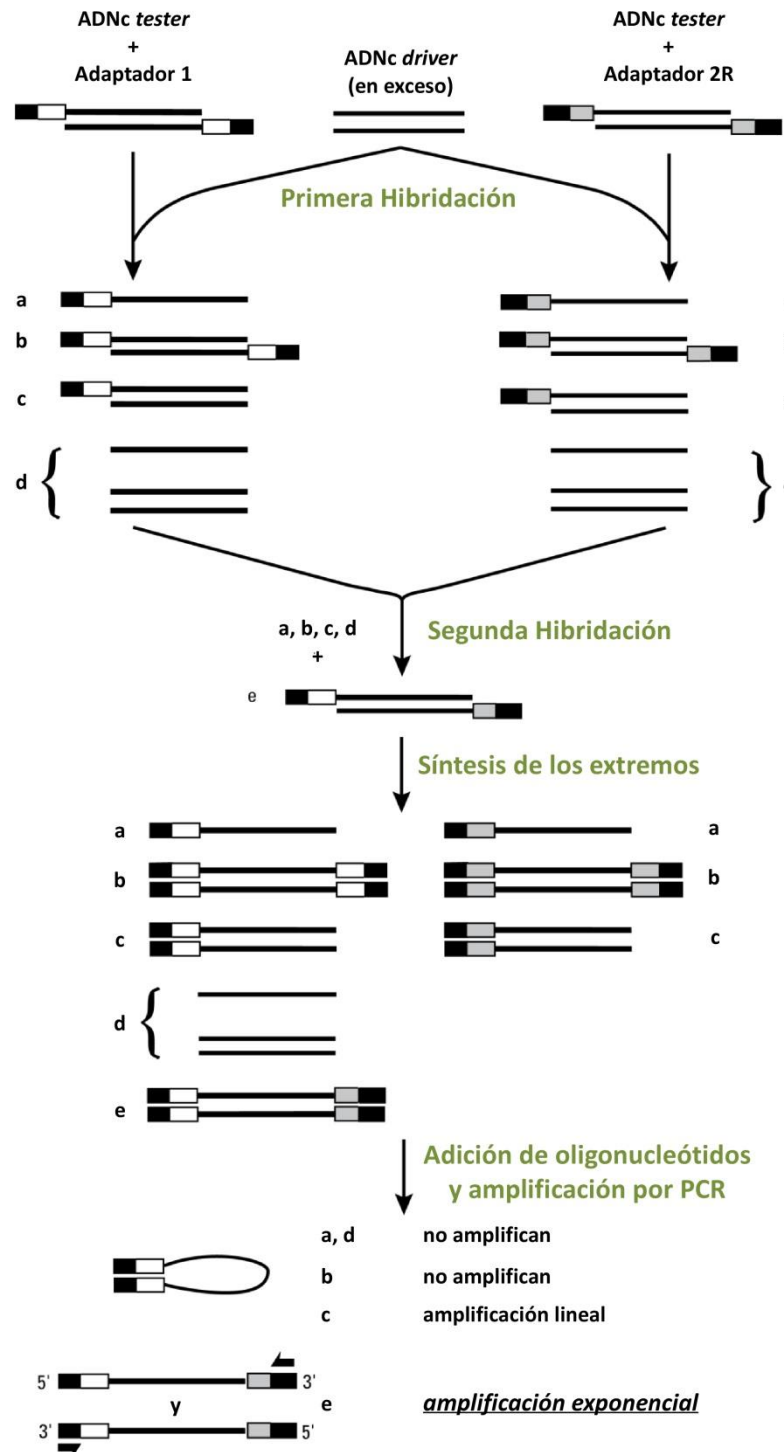
Para la hibridación sustractiva, se usó el kit *SMARTer<sup>TM</sup> PCR cDNA Synthesis* (Clontech), siguiendo principalmente las instrucciones descritas por el fabricante. Esta técnica de hibridación sustractiva se basa en la amplificación selectiva por PCR de las secuencias expresadas diferencialmente entre dos poblaciones (**Figura m1**).

En primer lugar, los ADNc *tester* y *driver* se digirieron con la enzima de restricción *RsaI* (ver **Sección 2.5.2.**), para obtener fragmentos cortos de ADN con extremos romos. El producto de la ligación se purificó usando el kit *NucleoSpin<sup>®</sup> Extract II* (Macherey-Nagel), siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante. Posteriormente, se ligaron los fragmentos de ADN de la muestra *tester* a los adaptadores (suministrados por el kit). La muestra de ADN *tester* se dividió en dos. Una de las fracciones se ligó al Adaptador 1, y la otra fracción se ligó al Adaptador 2R.

En una primera hibridación, las secuencias expresadas diferencialmente se igualaron y se enriquecieron. En este paso, se pusieron en contacto cada una de las 2 fracciones de ADN *tester* (con el respectivo adaptador), con el ADN *driver* en exceso. Las muestras se desnaturalizaron por calor y posteriormente se volvieron a naturalizar, generándose las moléculas tipo **a**, **b**, **c** y **d** en cada muestra (**Figura m1**).

En una segunda hibridación, se unieron los productos de las dos hibridaciones primarias, para generar fragmentos de ADN que pudieran amplificarse por PCR. En esta segunda hibridación, sólo pudieron hibridar los fragmentos de ADN *tester* no hibridados en la primera hibridación, generándose fragmentos de ADN de cadena doble con ambos adaptadores (**Figura m1**, moléculas **e**). Finalmente, las secuencias expresadas diferencialmente se amplificaron por PCR, usando oligonucleótidos que hibridaban específicamente con los adaptadores. Así, sólo las moléculas que contenían ambos adaptadores (moléculas **e**) pudieron amplificarse, obteniendo un producto de PCR enriquecido en las secuencias sobre-representadas en las muestras *tester*.





**Figura m1.** Esquema de la sustracción de ADNc mediante *PCR-Select™ cDNA Substracción (Clontech)*. Las moléculas de tipo e se forman sólo si la secuencia se encuentra sobreexpresada en el ADNc tester. Las líneas negras representan el ADNc digerido con *RsaI*. Los cuadrados negros representan el extremo exterior de los adaptadores, y los cuadrados claros representan el extremo interior del Adaptador 1 (blanco) y del Adaptador 2R (gris). Adaptado <http://www.clontech.com>.

### 6.2. Clonación y análisis de la genoteca.

Los productos de PCR se insertaron en el vector *pGEM<sup>®</sup>-T Easy* (Promega), gracias a la cola de adenina que la polimerasa deja al final de la secuencia amplificada. El vector *pGEM<sup>®</sup>-T Easy* se suministra linealizado a partir de la región *polylinker*, con extremos 3'-T, por lo que puede ser insertado directamente el producto de PCR. El inserto y el vector se ligaron (ver **Sección 2.5.2.**) y se introdujeron en *E. coli* por transformación (ver **Sección 3.1.**) Posteriormente, se seleccionaron las colonias transformantes positivas por la actividad  $\beta$ -galactosidasa (ver **Sección 3.1.**). Se purificó y secuenció el ADN plasmídico de 116 de los clones seleccionados, usando como cebador el oligonucleótido T7, que hibridaba específicamente con uno de los extremos de la región *polylinker* del vector *pGEM<sup>®</sup>-T Easy*.

Las secuencias se analizaron por homología mediante *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los genes caracterizados se clasificaron mediante ontología genética basándonos en sus homólogos de Arabidopsis, usando la base de datos *TAIR* (*The Arabidopsis Information Resource*).

## 7. Análisis transcripcional por RT-qPCR.

Los genes seleccionados por hibridación sustractiva fueron analizados transcripcionalmente por RT-qPCR, comparando la acumulación de ARNm entre las plántulas transgénicas 35S:A9 y sus hermanas no transgénicas. Se analizaron por RT-qPCR los ADNc correspondientes a 3 extracciones distintas de ARN de plántulas de una línea 35S:A9 (A9<sub>1</sub>) y su correspondiente hermana NT (NT<sub>1</sub>). La expresión de cada gen se comprobó analizando 3 repeticiones técnicas por réplica biológica.

Para el cálculo de la abundancia, el valor obtenido para cada gen se normalizó usando como referencia interna de la muestra de ADNc, los valores obtenidos los genes correspondientes al factor de elongación EF-1a, la proteína ribosomal L25 y la enzima de conjugación de la ubiquitina E2 (Ntubc2). Estos genes usados como referencia interna no varían su expresión en las muestras a comparar, por lo que permiten normalizar los valores de expresión obtenidos.

### 7.1. Diseño de los oligonucleótidos.

Para cada gen, se diseñó una pareja de oligonucleótidos específicos para RT-qPCR a partir de las secuencias obtenidas de la genoteca de hibridación sustractiva (ver **Sección 6.2.**), a través de la aplicación *web Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>). Se usaron como parámetros de búsqueda una temperatura de fusión óptima de 60°C y un tamaño óptimo de 20 nucleótidos. Además, las parejas de oligonucleótidos debían amplificar un fragmento de 100-150pb, con una complementariedad máxima de 3,00. Los oligonucleótidos seleccionados se describen en la **Tabla m1**. Para cada uno de los 3 controles internos se usaron los oligonucleótidos específicos descritos previamente en Schmidt & Delaney (2010) (**Tabla m2**).

La eficiencia de cada pareja de oligonucleótidos se valoró a partir de una curva de calibrado, antes de su uso en el cálculo de la abundancia relativa de su gen específico. La especificidad de cada pareja de oligonucleótidos se comprobó mediante una curva de disociación (60-95 °C), tras la RT-qPCR.

### 7.2. Condiciones de la reacción de RT-qPCR.

Las reacciones de RT-qPCR se realizaron en un sistema *Mastercycler® ep realplex real-time PCR* (Eppendorf). Se usó el kit *SensiFAST™ SYBR® No-ROX* (Bioline), siguiendo principalmente las indicaciones descritas por el fabricante. Los volúmenes se adaptaron para un volumen final de 10 µl de reacción, usando 1 µl de ADNc.

Para la reacción de RT-qPCR, se usaron las siguientes condiciones estándar: 95 °C durante 3 min, seguido por 40 ciclos de: 95 °C durante 5 s; 58 °C durante 10 s; 72 °C durante 15 s. Finalizada la reacción de RT-qPCR, se realizó la curva de *melting*, añadiendo un ciclo final de: 95 °C durante 15 s; 60 °C durante 15 s; 95 °C durante 15 s.

**Tabla m1.** Oligonucleótidos usados para el análisis de la inducción mediante RT-qPCR. Oligonucleótidos escritos en sentido 5'-3'.

Genes	Oligonucleótidos	
	Forward	Reverse
CP47 (PsbB)	GCTTCGTTTGCTTGCTCTT	TGCCTGTCTTTTTGTAGTTGGA
PsbI	TGACGCTTTCCTTCCAGT	TTGACACCAAGCAATGAAGC
PsbH	AGAGAATGGGTCTGTCATCTTGA	CCGGACACGAGGTCTGAATA
PSbO1	GGGAACTGGAACTGCTAACC	CGTGAATGATGTGGGCTCTA
PsbP	GCAGAAGTGGGAGGGAAAC	TTTACTGTGGCTGTGACCAA
PsbR	TTTGTGCGGTGATGAGTTC	ATGGCTGTGCGGTCTTGAT
PsbX	TTGCCAGTGAATCCATCAAA	GGAACCACCATTGAAGCTGT
CP29	ATGGGAGATGGGCTATGTTG	ATGGAGAATGGGAGTGGTTG
PetM	CATTGAAAACCCCATCACAA	CAACAGCAACTCCAACGAGA
Ycf3	CCTATTACAGAGATGGGATGTCG	CATTACTTGTGTGGATAAGCCCTA
PsaG	GGAGTGAGCCATTTTGAAGC	AGCCCCAAGCAAGAACATC
PsaH	GCTCCATTACCGGAACAAAA	CCCAAATCCTCCAAGTCAAA
PsaN	ACCGCTGCTTCTCTCAAC	GCCAACCTCTTCTGTCAATC
PsaO	TTGGTTTGATTGGATGGTTG	TGGGGAAATGAGAGAGTTGAG
AtpB	GCAGAAACAATTCGAGGATTTT	AGTTCATAGCCTTCGCGGTA
AtpD	CGCGTGAGCTAATCAAAG	CTGCGATTCCAATTTCAAA
AtpE	TTACCAAATCACGCCCTAT	AGCAAAACCACCCATCAGAG
AtpG	CCCTCGCATCAAATCTCAAG	GGAAAAGGAACTCAGCCATT
sHSP-P	TCTTGATGTCTCCCTTTCTG	ATTTCCCTACTGCTGATGA
POR-1	GACAGGAAAATGGCATGTGA	TATCGACAAACTGGCGAACA
Tiamina Sintetasa	AGCAGGGTCAAGCATTATC	ATTCTCGCAACCACAAACC
Tiorredoxina <i>m</i>	CTCTCCGCCCTTGAAAATC	ACCCCGTCATTGGTGAAC
PEPC	CTTCAGGTGCTGGGCATAA	GGCAAACATTGAGGGTGGTA
Ribulosa-fostato Epimerasa	AAGTTGACGGTGGTGTGGT	CCTTTTGCTGTCTTGATTCTT
Rubredoxina (similar)	GCAGCAGGAGGAGGAGAAAT	GCAAACCAGGAGGAATGG
bHLH61	TCGGATGCTAGGGTTTCTTG	GCTTTGGCTCCAGTTCCTTA
LRR quinasa	GCACTCGCATATCTTACCA	ATCCAGCAAGGGAAGGAACT
SAP1/SAP5 (similar)	TCCTCATAAATTCGCCAACA	CGGTGAAACGCTCTCTTTTA
MYB1	AAAAGGGGACTGGAGGAACA	GCTGTCTCTGGTAGTATTCTGAGC
NDPK	AAAGAGGACTTGTGGGGAGA	GGGGAAGAATGGTTGGACT

**Tabla m2.** Oligonucleótidos usados como controles internos para el análisis de la inducción mediante RT-qPCR. Oligonucleótidos descritos por Schmidt & Delaney (2010). Oligonucleótidos escritos en sentido 5'-3'.

Genes	Oligonucleótidos	
	Forward	Reverse
Factor de elongación EF-1a	TGAGATGCACCACGAAGCTC	CCAACATTGTCACCAGGAAGTG
Proteína ribosomal L25	CCCCTCACCACAGAGTCTGC	AAGGGTGTGTGTCTCAATCTT
Ubiquitina E2 (Ntubc2)	CTGGACAGCAGACTGACATC	CAGGATAATTTGCTGTAACAGATTA

## 8. Extracción y análisis de Proteínas.

### 8.1. Extracción de proteínas.

#### 8.1.1. Extracción de proteínas con tampón Laemmli.

Para la separación de proteínas por electroforesis desnaturizante SDS-PAGE (ver **Sección 8.4.1.**), se usaron generalmente muestras proteicas extraídas mediante tampón Laemmli:

El material vegetal, se congeló y se redujo a polvo usando N<sub>2</sub> líquido en un mortero frío. Después, se homogeneizaron 150 mg de material vegetal en 150 µl de **tampón Laemmli 2x**, mediante la ayuda de un homogeneizador. El extracto se hirvió durante 10 min, y se centrifugó a 12.000 g durante 5 min. Se recogió la fracción soluble, se cuantificó por el método de Bradford (ver **Sección 8.3.1.**) y se conservó a -20 °C.

Alternativamente, para la preparación de extractos de proteínas procedentes de raíces, donde existe un alto contenido en agua, se sustituyó el **tampón Laemmli 2x** por **tampón Laemmli 4x**, para obtener muestras de proteínas más concentradas. Se homogeneizaron 150 mg de material vegetal procedente de raíces en 75 µl de **tampón Laemmli 4x**.

**Tampón Laemmli:** 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10 % glicerol (p/v), 2,5 % β-mercaptoetanol (v/v), 1 % SDS (p/v).

### 8.1.2. Extracción de proteínas con tampón fenol.

Para la separación de proteínas por electroforesis 2D-PAGE, se usaron generalmente muestras proteicas extraídas mediante el método del tampón fenol, descrito por Lehmann *et al.* (1995). Los volúmenes se ajustaron para 150 mg de material vegetal inicial. La resuspensión final de las proteínas se hizo en 160  $\mu$ l de **tampón de muestra 2D** (ver **Sección 8.4.2.**). El extracto de proteínas se cuantificó mediante el método de Bradford (ver **Sección 8.3.1.**) y se conservó a -20 °C.

Con este método, se consiguieron extractos proteicos libres de impurezas, los cuales pudieron ser usados para la resolución de proteínas mediante isoelectroenfoque, en el primer paso de la electroforesis 2D-PAGE (ver **Sección 8.4.2.**).

### 8.2. Aislamiento de membranas tilacoidales.

Las membranas tilacoidales se aislaron esencialmente tal como fue descrito por Lepistö *et al.* (2009). El material vegetal se congeló y se redujo a polvo usando N<sub>2</sub> líquido en un mortero frío. Después, bajo un ambiente de luz tenue, se homogeneizó con **tampón de aislamiento** frío, suplementado con 1mM del inhibidor de proteasas *Pefabloc*® (*Roche*). Se usó 1 ml de tampón por cada 200 mg de material vegetal. Los extractos se pararon a través de un filtro de *Miracloth* (*Calbiochem*). El extracto filtrado se centrifugó a 6.000 *g* a 4 °C durante 5 min. La fracción no soluble, la cual contenía las membranas, se resuspendió en **tampón de lavado**, y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones. Finalmente, las membranas se resuspendieron en **tampón de aislamiento** suplementado con *Pefabloc*®. Se usó 1  $\mu$ l de tampón por mg de material de partida. Las muestras se conservaron a -80 °C en alícuotas de 50  $\mu$ l.

Alternativamente, para los extractos de proteína total usados como control en la **Figura r4A**, el material vegetal, una vez reducido a polvo, se homogeneizó bajo un ambiente de luz tenue, con **tampón de aislamiento** frío suplementado con *Pefabloc*®, y se conservó a -80°C.

**Tampón de aislamiento:** 330 mM sacarosa, 25 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaF.

**Tampón de lavado:** 25 mM HEPES-KOH (pH 7,4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaF.

La concentración de proteínas en los extractos de membranas tilacoidales se cuantificó por el método de Lowry (ver **Sección 8.3.2.**). La concentración de clorofila se cuantificó tal como se describe en **Sección 9.**

### 8.3. Cuantificación de proteínas.

#### 8.3.1. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

Para la cuantificación de proteínas se usó el reactivo *Protein Assay (Bio-Rad)*, basado en el método de Bradford. Se siguieron las indicaciones descritas por el fabricante.

#### 8.3.2. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.

El contenido de proteínas de los extractos de membranas tilacoidales se cuantificó usando una modificación del método de Lowry, descrita por Markwell *et al.* (1978).

### 8.4. Electroforesis de proteínas.

#### 8.4.1. Electroforesis SDS-PAGE.

Una vez obtenidos los extractos de proteínas, fueron analizados en minigeles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). Para ello se usó una unidad de electroforesis vertical *Hoefer Mighty*. La separación de proteínas se hizo en un sistema discontinuo: con un gel de empaquetamiento y un gel de separación. Las muestras se diluyeron en **tampón Laemmli 2x** (ver **Sección 8.1.1.**) con 0,1 % azul de bromofenol, y se hirvieron durante 5 min inmediatamente antes de ser cargadas. Generalmente, se usaron 15 µg de proteína para extractos de plántulas, y 25 µg para extractos de semillas. Como marcadores de peso molecular se usó la mezcla de proteínas pre-teñidas *Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standards (Bio-Rad)*. La electroforesis se realizó a voltaje constante (100 V) hasta que el azul de bromofenol alcanzó el borde del gel.

**Gel de empaquetamiento:** 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1 % SDS (p/v), 5 % Acrilamida/Bis 37:5:1 (40%) (*Bio-Rad*), 0,05 % APS (p/v), 0,1 % TEMED (v/v).

**Gel de separación:** 375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,1 % SDS (p/v), 10-15 % Acrilamida/Bis 37:5:1 (40%) (*Bio-Rad*), 0,05 % APS (p/v), 0,05 % TEMED (v/v).

**Tampón de electroforesis SDS-PAGE:** 25mM Tris, 194mM glicina, 0,1% SDS (p/v).

### 8.4.2. Electroforesis 2D-PAGE.

Las muestras de proteínas extraídas mediante tampón fenol (ver **Sección 8.1.2.**) se resolvieron por electroforesis 2D-PAGE, mediante una primera resolución de las proteínas en función de su punto isoelectrico (pI) por isoelectroenfoque, y una segunda resolución mediante electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE.

#### Isoelectroenfoque.

El isoelectroenfoque se realizó usando un sistema *Protean® IEF cell system* (*Bio-Rad*). Para la resolución de las proteínas, se usaron geles de gradiente de pH *ReadyStrip™ IPG Strip* (*Bio-Rad*), de 7 cm de longitud y con un rango de pH 5,0 y pH 8,0. En un primer paso, los geles se rehidrataron las tiras por rehidratación pasiva con 160 µl de **tampón de rehidratación** durante 15 h a 20 °C.

A la muestra de proteínas se añadieron 80 µl de **tampón de muestra 2D**, 0,8 µl de *Bio-Lyte® pH 3-10* (*Bio-Rad*) y 1 µl de azul de bromofenol. Para muestras procedentes de plántulas, se usaron 140 µg de proteínas, y para muestras de semillas se usaron 300 µg de proteínas. Posteriormente, las muestras de proteínas se cargaron sobre los geles de gradiente de pH usando pocillos de plástico fijados en el extremo positivo de la tira rehidratada. Las proteínas se enfocaron en función del pI mediante el siguiente programa: 15 min a 250 V, seguido de un aumento suave del voltaje hasta 4.000 V durante 2 h, y un tercer paso de aumento del voltaje hasta 20.000 V. Tras terminar el isoelectroenfoque, las tiras se conservaron a -80 °C.

**Tampón de rehidratación:** 8 M Urea, 2 % CHAPS (p/v), 50 mM DTT.

**Tampón de muestra 2D:** 9 M Urea, 2 % CHAPS (p/v), 65 mM DTT.



### Equilibrado de las muestras para electroforesis SDS-PAGE.

Tras la resolución por isoelectroenfoque, las proteínas se separaron en función de su peso molecular por electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida, para lo cual fue necesario un paso intermedio de equilibrado las muestras en los geles de gradiente de pH. Las muestras procedentes del isoelectroenfoque se incubaron con 2,5 ml de **tampón de equilibrado I** durante 10 min en agitación suave, seguido de una incubación con 2,5 ml de **tampón de equilibrado II** durante 10 min. Posteriormente, las muestras se lavaron con **tampón de electroforesis SDS-PAGE** (ver **Sección 8.4.1.**) y se colocaron directamente sobre el gel de separación SDS-PAGE. La electroforesis SDS-PAGE se realizó tal como se indica en la **Sección 8.4.1.**

**Tampón de equilibrado I:** 6M Urea, 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8), 2 % SDS (p/v), 130 mM DTT.

**Tampón de equilibrado II:** 6M Urea, 0,375 M Tris-HCl (pH 8,8), 2 % SDS (p/v), 2,5 % iodoacetamida (p/v).

### 8.4.3. Electroforesis en geles *Blue Native*.

La electroforesis en estado nativo mediante geles *Blue Native* se realizó según fue descrito por Cline & Mori (2001), con ligeras modificaciones. Las muestras de membranas tilacoidales (100 µg de proteína total), se lavaron por centrifugación a 6.000 *g* a 4 °C durante 3 min, y resuspensión en 100 µl de solución 0,33 M Sorbitol, 50 mM BisTris-HCl (pH 7,0). Posteriormente, se centrifugaron a 6.000 *g* a 4 °C durante 3min, y se resuspendieron en 10 µl de solución 25 mM BisTris-HCl (pH 7,0), 20 % glicerol (p/v). A las muestras se añadieron 10 µl de **tampón de solubilización** y se incubaron durante 30 min a 4 °C. y. Se recogió el material soluble tras centrifugar a 16.000 *g* y 4 °C durante 15 min y se añadieron 2 µl de **tampón de muestra BN**.

**Tampón de solubilización:** 25 mM BisTris-HCl, 20 % glicerol (p/v), 2 % β-dodecil-n-maltósido (p/v), pH 7,0.

**Tampón de muestra BN:** 100 mM BisTris-HCl, 1 M ácido 6-amino-caproico, 30 % sacarosa (p/v), 0,05 % Serva G (p/v), pH 7,0.

Las muestras se cargaron en un gel con gradiente de acrilamida entre el 5 y el 13,5 %. Para la obtención del gel de gradiente, se mezclaron dos soluciones 0 % y 13,5 % acrilamida, usando

un creador de gradientes. Los geles se corrieron durante 4-5 h a 150 V en una unidad de electroforesis vertical *Hoefer Mighty*, en una habitación con temperatura controlada entre 4 y 8 °C. El tampón del cátodo, inicialmente con colorante (0,1 % Serva G (p/v)), se sustituyó por tampón del cátodo sin colorante, tras 2 h de electroforesis. La electroforesis se detuvo cuando la mayor parte del frente con tinción había salido del gel.

**Gel de empaquetamiento:** 50 mM BisTris-HCl (pH 7,0), 0,5 M ácido 6-amino-caproico, 4 % Tris-acrilamida (p/v), 0,24 % Bis-acrilamida (p/v), 0,05 % APS (p/v), 0,002% TEMED (v/v).

**Solución 0% acrilamida:** 50 mM BisTris-HCl (pH 7,0), 0,5 M ácido 6-amino-caproico, 20 % glicerol (p/v), 13,5 % Tris-acrilamida (p/v), 0,8 % Bis-acrilamida (p/v), 0,025 % APS (p/v), 0,0001 % TEMED (v/v).

**Solución 13,5% acrilamida:** 50 mM BisTris-HCl (pH 7,0), 0,5 M ácido 6-amino-caproico, 20 % glicerol (p/v), 13,5 % Tris-acrilamida (p/v), 0,8 % Bis-acrilamida (p/v), 0,025% APS (p/v), 0,0001 % TEMED (p/v).

**Tampón del cátodo:** 50 mM Tricina, 15 mM BisTris-HCl.

**Tampón del ánodo:** 50 mM BisTris-HCl, pH 7,0.

Tras la electroforesis, se fotografiaron los geles, se tiñeron con azul coloidal de Coomassie (ver **Sección 8.5.**) o se transfirieron a membranas de PVDF para el análisis de proteínas por *western blot* (ver **Sección 8.6.**).

### 8.5. Tinción de proteínas con azul coloidal de Coomassie.

Los geles *Blue-Native* se tiñeron con azul coloidal de Coomassie G-250, para detectar los complejos proteicos, siguiendo el protocolo descrito por Neuhoﬀ *et al.*, (1988).

### 8.6. Detección de proteínas por *western blot*.

La detección de proteínas por *western blot* fue descrita inicialmente por Towbin *et al.* (1979) y se basa en la especificidad de unión antígeno-anticuerpo. Este método permite la detección de proteínas mediante el uso de anticuerpos específicos frente a la proteína de interés.

### 8.6.1. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF.

Las proteínas, previamente resueltas mediante electroforesis (ver **Sección 8.4.**), se transfirieron a una membrana de PVDF *Amersham Hybond<sup>TM</sup>-P* (GE Healthcare), por la aplicación de corriente eléctrica, usando un sistema de transferencia de transferencia húmeda *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad). Se siguieron las indicaciones descritas por los fabricantes. Como tampón de transferencia se usó 10 mM CAPS (pH 11,0). La transferencia se hizo a voltaje constante (100 V) durante 1 h y 15 min.

### 8.6.2. Inmunodetección.

Tras la transferencia, la membrana se bloqueó en una solución de **tampón TBS-T** (0,1 % Tween-20) con 5 % de leche en polvo (p/v), durante 2 h en agitación suave. A continuación, se hibridaron las membranas con el correspondiente anticuerpo específico (anticuerpo primario; ver **Tabla m3**) frente a la proteína de interés, diluido en una solución de **tampón TBS-T** (0,1 % Tween-20) con 5 % de leche en polvo (p/v). La hibridación con el anticuerpo primario se hizo durante toda la noche a 4 °C y en agitación suave.

Alternativamente, para los *western blot* tras geles *Blue-Native* (ver **Sección 8.4.3.**), el bloqueo se hizo durante toda la noche a 4 °C, para facilitar la eliminación del colorante Serva G de las membranas. La hibridación con el anticuerpo primario se realizó durante 4 h a temperatura ambiente.

**Tabla m3.** Anticuerpos primarios usados para la detección de proteínas por *western blot*.

Anticuerpos	Dilución
Anti-sHSP CI (Coca <i>et al.</i> , 1994)	<sup>1</sup> / <sub>1.000</sub>
Anti-sHSP CII (Coca <i>et al.</i> , 1994)	<sup>1</sup> / <sub>1.000</sub>
Anti-HSP101/ClpB N-terminal (AS07 253, Agrisera)	<sup>1</sup> / <sub>30.000</sub>
Anti-HSP21 (AS08 285, Agrisera)	<sup>1</sup> / <sub>3.000</sub>
Anti-HSP70B ( AS06 175, Agrisera)	<sup>1</sup> / <sub>10.000</sub>
Anti-Psba C-terminal (AS05 084, Agrisera)	<sup>1</sup> / <sub>10.000</sub>
Anti-PsbP (AS06 167, Agrisera)	<sup>1</sup> / <sub>3.000</sub>
Anti-PsaB C-terminal (AS10 695, Agrisera)	<sup>1</sup> / <sub>1.000</sub>
Anti-HA-peroxidase (high affinity 3F10) (Roche)	<sup>1</sup> / <sub>10.000</sub>

Tras la incubación con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron 4 veces con **tampón TBS-T** (0,25 % Tween-20) por ciclos repetidos de 15 min en agitación suave. Tras los lavados, todos los anticuerpos usados, exceptuando el anticuerpo frente a la proteína HA (Anti-HA-peroxidase), necesitaron la hibridación con el anticuerpo secundario anti-IgG-peroxidase de conejo (NA934, *GE Healthcare*), para poder ser detectados posteriormente. Las membranas se hibridaron con el anticuerpo secundario a una dilución 1/20.000 en una solución de **tampón TBS-T** (0,1 % Tween-20) con 5% de leche en polvo (p/v), durante 1 h a temperatura ambiente. Tras la hibridación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron 4 veces con **tampón TBS-T** (0,25 % Tween-20) por ciclos repetidos de 15 min en agitación suave.

**Tampón TBS-T** (: 20mM Tris, 137mM NaCl 137mM, (pH 7,6).

A continuación, se procedió a la detección usando el sistema *ECL<sup>TM</sup> Prime* (*GE Healthcare*), siguiendo las instrucciones descritas por el fabricante. Se hicieron exposiciones a distintos tiempos, usando películas de autorradiografía *Amersham Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL* (*GE Healthcare*).

### 8.7. Cuantificación de señales de *western blot*.

Para la comparación de la acumulación de proteínas en las distintas muestras, se cuantificó la intensidad de señal obtenida en los ensayos de *western blot*, usando el programa *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>).

### 8.8. Solubilización de proteínas de las membranas tilacoidales.

Para eliminar contaminación con proteínas estromales, antes del tratamiento de solubilización, los extractos de membranas tilacoidales se lavaron 4 veces adicionales con tampón de lavado (ver **Sección 8.2.**), mediante ciclos repetidos de centrifugación a 6.000 g a 4 °C durante 5 min y resuspensión.

Para la solubilización de las proteínas sHSP-P y PsbP se usaron aproximadamente 15 µl de extractos de membranas tilacoidales (correspondiente a 5 µg de clorofila). Se añadieron 150 µl de la correspondiente solución de solubilización: 10 mM MES (pH 6,8) 0,25 M NaCl; 10 mM MES (pH 6,8) 1 M NaCl; o 0,8 M Tris-HCl, pH 8,4. Como tratamiento control, las muestras se trataron con **tampón de lavado** (ver **Sección 8.2.**). Las muestras se incubaron durante 1 h a 25 °C en

agitación vigorosa. Tras el tratamiento, las muestras se centrifugaron a 6.000 *g* a 4 °C durante 5 min. La fracción insoluble, que contenía la proteína no solubilizada unida a las membranas tilacoidales, se resuspendió directamente en **tampón Laemmli 2x** (ver **Sección 8.1.1.**). La fracción soluble, que contenía la proteína solubilizada, se precipitó durante toda la noche con 10 volúmenes de 10 % TCA (ácido tricloroacético) (p/v) en acetona a -20 °C. Se añadió BSA (20 µg por muestra) como proteína *carrier* para la precipitación. La proteína precipitada se lavó dos veces con acetona fría, se secó a temperatura ambiente, y se resuspendió en **tampón Laemmli 2x**.

Ambas fracciones de proteínas se analizaron por *western blot* tras electroforesis desnaturizante SDS-PAGE (ver **Sección 8.6.**), usando la cantidad de proteína correspondiente a 0,2 µg de clorofila inicial.

## 9. Cuantificación de pigmentos fotosintéticos.

Para la extracción de pigmentos fotosintéticos, las plántulas se incubaron en 80 % acetona en agua (v/v) durante toda la noche a temperatura ambiente y en agitación suave en oscuridad. A partir de la misma muestra, se cuantificaron los pigmentos fotosintéticos (Chl *a*, Chl *b* y Car) mediante espectrofotometría, aplicando las ecuaciones, longitudes de onda y coeficientes de absorbancia específicos para cada solvente descritos por Lichtenthaler & Buschmann (2001).

$$\text{Chl } a \text{ (}\mu\text{g/ml)} = 12,25 A_{663,2\text{nm}} - 2,79 A_{646,8\text{nm}}$$

$$\text{Chl } b \text{ (}\mu\text{g/ml)} = 21,50 A_{646,8\text{nm}} - 5,10 A_{663,2\text{nm}}$$

$$\text{Car (}\mu\text{g/ml)} = (1000 A_{470\text{nm}} - 1,82 \text{ Chl } a - 85,02 \text{ Chl } b)/198$$

Calculamos la cantidad de clorofila total como la suma de Chl *a* y Chl *b*.

## 10. Fluorescencia de la clorofila.

La integridad del PSII puede determinarse a partir de la medida de la fluorescencia de la clorofila  $\alpha$ . Esta técnica se basa en la energía liberada en forma de fluorescencia durante la transferencia de electrones desde la clorofila P680 del PSII hasta la quinona  $Q_A$ , el primer aceptor de electrones del PSII. Cuando la hoja se mantiene en oscuridad, la quinona  $Q_A$  se encuentra completamente oxidada, y puede ser reducida fotoquímicamente por completo por el PSII.

La fluorescencia de la clorofila se midió usando un analizador del rendimiento fotosintético *mini-PAM* (Walz). Inmediatamente tras el tratamiento de estrés (o el respectivo tratamiento control), las plántulas se colocaron sobre un portaobjetos de vidrio (76x26 mm) y se cubrieron con un cubreobjetos (60x24 mm). Las plántulas, situadas entre ambos vidrios, se sujetaron con pinzas *Dark Leaf Clip DLC-8* (Walz), y se mantuvieron en oscuridad durante un periodo de 25 min. Tras este periodo de adaptación a la oscuridad, se determinó la fluorescencia mínima de la hoja adaptada a la oscuridad ( $F_o$ ) con un pulso débil de luz roja, y la fluorescencia máxima de la hoja adaptada a la oscuridad ( $F_m$ ) con un pulso subsecuente de luz saturante ( $14.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante 0,8 s). El rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ) se determinó como el cociente entre la fluorescencia variable ( $F_v$ ;  $F_m - F_o$ ) y  $F_m$ .

En cada experimento independiente, se calculó el valor promedio de  $F_v/F_m$  a partir de seis medidas diferentes para cada línea y tratamiento, tomando plántulas de diferentes localizaciones de la placa Petri. Los números de repeticiones experimentales se indican en los pies de figura.

## 11. Tratamientos de estrés abiótico.

En nuestro estudio, hemos caracterizado los fenotipos de las distintas líneas transgénicas usando diferentes tratamientos de estrés. En todos los tratamientos de estrés, se han empleado plántulas de 3-4 semanas tras la germinación, cultivadas en **medio MS** sobre papel de filtro ( $50 \text{ g m}^{-2}$ ), bajo condiciones normales de cultivo *in vitro* (ver **Sección 1.1.3.**).

### 11.1. Tratamientos de deshidratación severa DT2.

Los tratamientos de deshidratación DT2 se realizaron tal como fue descrito en Prieto-Dapena *et al.* (2008):

Los ensayos de deshidratación se realizaron en recipientes cilíndricos de vidrio formados por dos partes superiores de placas Petri de vidrio de 14 cm de diámetro, que al cerrar una sobre otra, forman un espacio interno de 3 cm de altura y 295 ml de volumen. En el interior del recipiente, en el centro del cilindro inferior, se fijó la tapa de una placa Petri de plástico de 9 cm de diámetro, formando el receptáculo donde posteriormente se colocaron las plántulas para su deshidratación. En el espacio en forma de anillo situado entre ambas placas Petri, se añadieron 9 g de sílica gel (en esferas de 3-6 mm de diámetro, con indicador de cloruro de cobalto; *Panreac*). El sílica gel se trató previamente durante toda la noche a 80 °C, para maximizar la absorción de agua durante el tratamiento.

Para los tratamientos de deshidratación, las plántulas cultivadas sobre papel de filtro en medio MS, se pasaron a un disco de papel de aluminio (de aproximadamente 8,3 cm de diámetro), previamente pesado. Para obtener los mismos niveles de deshidratación dentro de cada pareja de líneas NT/T, el disco de papel de aluminio se dividió por una línea en dos mitades iguales, colocando en mitad 20 plántulas de una línea, y en la otra mitad, 20 plántulas de la correspondiente línea hermana, previamente pesadas. Los discos de papel de aluminio con las plántulas se colocaron dentro del receptáculo central del recipiente cilíndrico, y se añadió el sílica gel en el anillo exterior al receptáculo. El recipiente se cerró herméticamente y se incubó durante 8 h a 25 °C en la oscuridad.

Para el análisis de la supervivencia tras los tratamientos de deshidratación, se añadieron 6 ml de agua desionizada (MiliQ), se rehidrataron durante 1 h a 25 °C en oscuridad, y posteriormente se dejaron recuperar bajo condiciones normales de cultivo *in vitro* (ver **Sección 1.1.3.**). Tras 7 días de recuperación, se fotografiaron las plántulas y se cuantificó la supervivencia.

Para la medida de  $F_v/F_m$  tras la deshidratación en las plántulas 35S:A9 y NT, se modificaron los tratamientos DT2, sustituyendo el disco de papel de aluminio por portaobjetos de vidrio (76 x 26 mm), y reduciendo la cantidad de sílica gel a 5g. En cada portaobjetos, se colocaron 9

plántulas de una misma línea. En cada recipiente, se colocaron 2 portaobjetos, correspondientes a una línea 35S:A9 y su línea hermana no transgénica.

El contenido de agua tras la deshidratación se calculó en relación al peso seco, obtenido tras secar las plántulas durante 16h a 160°C. El potencial hídrico se calculó a partir del contenido de agua tras la deshidratación, siguiendo las isotermas de desorción de agua descrita por Prieto-Dapena *et al.* (2008).

### 11.2. Tratamientos de estrés oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Para los tratamientos de estrés oxidativo, el papel de filtro (50 g m<sup>-2</sup>) sobre el que se cultivaron las plántulas, con aproximadamente 60 plántulas por placa Petri, se pasó del **medio MS** a una solución de lavado con la correspondiente concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> usada en el tratamiento: 0mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para los tratamientos control, y 200 o 300 mM para los tratamientos estándares (también usados tratamientos con 50 y 500 mM en experimentos preliminares, ver **Figura r8**). Las soluciones se suplementaron una agente surfactante, añadiendo 0,1 % Tween-20 (*Sigma-Alrich*) (v/v), para facilitar la penetración de la solución dentro de la plántula. Tras el lavado, el papel de filtro, con las plántulas, se colocó en una placa Petri sobre 6 papeles de filtro (73 g m<sup>-2</sup>) humedecidos con 6 ml de la correspondiente solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las placas Petri se incubaron durante 24 h a 20-25 °C en oscuridad. Tras el tratamiento, las plántulas se lavaron con agua desionizada (MiliQ).

Para el análisis de la supervivencia tras los tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se sellaron las placas Petri con las plántulas lavadas, y se dejaron recuperar bajo condiciones normales de cultivo *in vitro* (ver **Sección 1.1.3.**). Tras 7 días de recuperación, se fotografiaron las plántulas y se cuantificó la supervivencia.

### 11.3. Tratamientos de inducción de la senescencia vegetativa.

#### 11.3.1. Inducción de la senescencia en la oscuridad.

Para los tratamientos de inducción de la senescencia en la oscuridad, el papel de filtro (50 g m<sup>-2</sup>) sobre el que se cultivaron las plántulas, con aproximadamente 60 plántulas por placa Petri,



se lavó 2 veces con agua desionizada (MiliQ) estéril, para eliminar restos de **medio MS**. Tras el lavado, el papel de filtro, con las plántulas, se colocó en una placa Petri sobre 6 papeles de filtro ( $73 \text{ g m}^{-2}$ ) humedecidos con 6 ml de agua desionizada (MiliQ) estéril. Las placas Petri se sellaron y se envolvieron con papel de aluminio doble, y se colocaron dentro de una caja opaca, para evitar cualquier entrada de luz. La caja se incubó hasta un máximo de 5 semanas a  $24\text{-}25^\circ\text{C}$ . Tras este periodo, el papel de filtro con las plántulas se pasó a placas Petri con **medio MS**. La cuantificación de pigmentos fotosintéticos y la medida de  $F_v/F_m$  se hicieron inmediatamente tras el tratamiento. Para el análisis de la supervivencia tras el tratamiento en la oscuridad, las plántulas se dejaron recuperar bajo condiciones normales de cultivo *in vitro* (ver **Sección 1.1.3.**). Tras 7 o 10 días de recuperación, se fotografiaron las plántulas y se cuantificó la supervivencia.

### 11.3.2. Inducción de la senescencia por falta de nutrientes a la luz.

Para los tratamientos de inducción de la senescencia por falta de nutrientes a la luz, el papel de filtro ( $50 \text{ g m}^{-2}$ ) sobre el que se cultivaron las plántulas, con 21 plántulas por placa Petri (dispuestas en torno al centro de la placa), se lavó 2 veces con agua desionizada (MiliQ) estéril, para eliminar restos de **medio MS**. Tras el lavado, el papel de filtro, con las plántulas, se colocó en una placa Petri sobre 6 papeles de filtro ( $73 \text{ g m}^{-2}$ ) humedecidos con 6 ml de agua desionizada (MiliQ) estéril. Las placas Petri se sellaron y cultivaron durante 6 días en ciclo de luz 16 h/8 h (día/noche) a una intensidad de luz de aproximadamente  $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , y a  $24\text{-}25^\circ\text{C}$ . Inmediatamente tras el tratamiento, se cuantificaron los pigmentos fotosintéticos, el valor de  $F_v/F_m$  y la supervivencia, y se fotografiaron las plántulas.

### 11.4. Tratamiento de aclimatación al calor.

Para la aclimatación al calor, las placas Petri con las plántulas cultivadas en **medio MS**, se sellaron herméticamente con papel de plástico, para evitar la entrada de agua. Las placas se sumergieron en un baño con agua a  $40^\circ\text{C}$  durante 3 h.

Inmediatamente tras el tratamiento de aclimatación al calor, el material vegetal se congeló con  $\text{N}_2$  líquido y se conservó a  $-80^\circ\text{C}$  para el análisis de proteínas, o se sometieron al correspondiente tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  o de termotolerancia.

### 11.5. Ensayos de termotolerancia.

Para los ensayos de termotolerancia, se usaron plántulas cultivadas bajo condiciones normales de cultivo *in vitro*, y plántulas previamente acondicionadas al calor (ver [Sección 11.4.](#)). Las placas Petri con las plántulas cultivadas en **medio MS**, se sellaron herméticamente con papel de plástico, para evitar la entrada de agua. Las placas se sumergieron en un baño con agua a 48 °C durante 2,5 h. Tras el tratamiento a 48 °C, se eliminó el papel de plástico, y se dejaron recuperar las plántulas bajo condiciones normales de cultivo *in vitro* (ver [Sección 1.1.3.](#)). Tras una semana de recuperación, se fotografiaron las plántulas.

### 12. Cuantificación de la pérdida de electrolitos.

La pérdida de electrolitos se determinó mediante un conductímetro *EC-Meter GLP 31+* (*CRISON*). Para cada experimento, se incubaron 50-60 plántulas por línea en 25 ml de agua desionizada (MiliQ) durante 22 o 24 h con agitación suave a temperatura ambiente. Se cuantificó la liberación de electrolitos al medio mediante la medida de la conductividad a diferentes tiempos, durante el tratamiento. Para la cuantificación de electrolitos totales, se midió la conductividad a temperatura ambiente de las muestras una vez terminado el tratamiento, tras romper todas las membranas celulares por esterilización por autoclave. La cuantificación de pérdidas de electrolitos, para cada línea y experimento, se determinó como el porcentaje de electrolitos liberados al medio con respecto al total de electrolitos presentes en las muestras.

### 13. Análisis estadístico.

En experimentos en los que los datos mostraron una distribución normal o pudieron normalizarse mediante una transformación logarítmica, se compararon estadísticamente los grupos experimentales (A9 y NT; A4a y NT, o A9/A4a y A9) mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Alternativamente, cuando los datos no pudieron normalizarse, se compararon estadísticamente los grupos experimentales mediante el test *t-Student*. En cada comparación realizada en nuestro estudio, se aporta el valor estadístico (F o t) y la probabilidad (P).

Consideramos diferencias estadísticamente significativas entre grupos experimentales para valores de  $P < 0,05$ .

Los valores correspondientes a cada grupo experimental (NT, A9, A4a y A9/A4a) se calcularon como el valor promedio obtenido con al menos dos líneas independientes por condición experimental, tal como se detalla en los pies de figura. El análisis estadístico de las diferencias entre cada grupo experimental fue consistente con los resultados obtenidos al analizar por separado cada pareja de líneas hermanas.



## Resultados



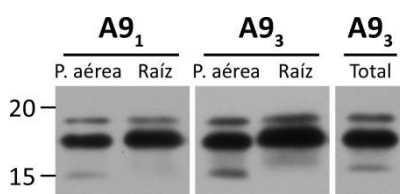
## A. Protección del aparato fotosintético mediada por el programa genético activado por el factor *HaHSFA9*.

El trabajo previo de nuestro laboratorio demostró que la sobreexpresión ectópica en plántulas de tabaco del factor de transcripción *HaHSFA9*, bajo el promotor constitutivo CaMV 35S (líneas 35S:A9), inducía la acumulación de proteínas HSP (HSP101, sHSP-CI y sHSP-CII). Esta acumulación de HSP iba acompañada de la adquisición de tolerancia a tratamientos de deshidratación severa en las plántulas 35S:A9, las cuales sobrevivían a pérdidas de hasta el 98 % del contenido inicial de agua. Esta supervivencia estaba limitada por las raíces, observándose una mayor tolerancia de la parte aérea de la plántula (Prieto-Dapena *et al.*, 2008). La protección y estabilización de las membranas celulares es esencial para la tolerancia de las plantas a la desecación (Hoekstra *et al.*, 2001). Además, la actividad fotosintética está considerada como la función celular más sensible a estrés (Allakhverdiev *et al.*, 2008). Así, durante la deshidratación se produce un incremento de ROS (Bartels & Sunkar, 2005), que puede causar daños críticos en los fotosistemas, principalmente en el fotosistema II (PSII) (Aro *et al.*, 1993; Nixon *et al.*, 2010). En este apartado, estudiamos si la sobreexpresión ectópica de *HaHSFA9* en plántulas de tabaco mejora y protege la estabilidad de las membranas celulares, especialmente las membranas tilacoidales, cuya actividad es esencial para la supervivencia de la planta. Esta estabilización podría ayudar a explicar la tolerancia a deshidratación severa descrita en las plántulas 35S:A9.

### 1. Acumulación reducida de sHSP-CI en las raíces de las plántulas 35S:A9.

La supervivencia limitada de las raíces, observada en las líneas 35S:A9 tras ensayos de deshidratación severa (Prieto-Dapena *et al.*, 2008), nos llevó a estudiar en primer lugar, la posible limitación de la acumulación de proteínas sHSP en las raíces de las plántulas 35S:A9, a temperaturas normales de crecimiento. Para ello, caracterizamos por *western blot* tras electroforesis desnaturizante SDS-PAGE la acumulación de las proteínas sHSP-CI en la parte aérea y las raíces de las plántulas de las líneas transgénicas de tabaco 35S:A9, descritas previamente por Prieto-Dapena *et al.* (2008) (**Figura r1**). Estas líneas 35S:A9 presentaban diferentes eventos de integración simple del transgén *35S:HaHSFA9* en homocigosis. En la parte aérea, el patrón de acumulación de sHSP-CI fue similar al observado en las muestras

correspondientes a plántulas completas. Sin embargo, en las raíces no se observó la presencia de la banda correspondiente a la sHSP-CI de menor peso molecular. Esta banda, con peso molecular aparente de aproximadamente 15 KDa, se corresponde con un polipéptido sHSP-CI caracterizado como específico de semillas (Prieto-Dapena *et al.*, 2006). La falta de acumulación ectópica en raíces de algunas de las isoformas sHSP-CI específicas de semillas podría correlacionarse con la falta de tolerancia a deshidratación severa observada en las raíces de las plántulas 35S:A9.



**Figura r1. Acumulación de sHSP-CI en la parte aérea y las raíces de las plántulas 35S:A9.** Detección de la acumulación de proteínas sHSP-CI en la parte aérea (P. aérea) y las raíces (Raíz) de las plántulas 35S:A9, mediante *western blot* tras electroforesis desnaturizante SDS-PAGE. Se comparan los resultados con la acumulación de sHSP-CI en extractos de plántulas enteras (Total). Se analizaron muestras de plántulas de 3-4 semanas correspondientes a 3 líneas homocigóticas independientes 35S:A9 (A9<sub>1</sub>, A9<sub>2</sub> y A9<sub>3</sub>). Se muestran resultados representativos correspondientes a 2 líneas 35S:A9 (A9<sub>1</sub> y A9<sub>3</sub>). A la izquierda, se indican los marcadores de peso molecular (KDa).

## 2. El programa genético activado por el factor *HaHSFA9* incluye la expresión de genes *shsp-P*.

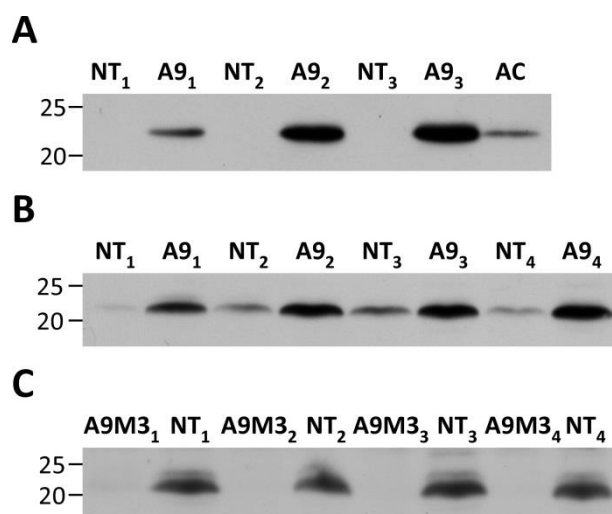
Los precedentes en la literatura muestran que las proteínas sHSP Plastidiales (sHSP-P) de las plantas superiores pueden proteger las membranas fotosintéticas y sus componentes frente a determinadas condiciones de estrés (Heckathorn *et al.*, 2002; Barua *et al.*, 2003; Neta-Sharir *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2007). Estos precedentes nos indujeron a estudiar la posible expresión de genes *shsp-P* mediada por el programa genético activado por *HaHSFA9*. La acumulación de proteínas sHSP-P en las plántulas 35S:A9, en condiciones normales de crecimiento, podría contribuir a la mayor supervivencia observada en los órganos fotosintéticos tras ensayos de deshidratación severa.



### 2.1. Acumulación de proteínas sHSP-P inducida por el factor *HaHSFA9*.

En primer lugar, analizamos la posible acumulación de proteínas sHSP-P, siguiendo la estrategia descrita previamente para el estudio de la acumulación de proteínas sHSP-CI y sHSP-CII (Prieto-Dapena *et al.*, 2006; Prieto-Dapena *et al.*, 2008; Tejedor-Cano *et al.*, 2010) (**Figura r2**). Usamos un anticuerpo comercial específico frente a la proteína HSP21, una sHSP-P de *Arabidopsis thaliana*. Analizamos por *western blot*, tras electroforesis desnaturizante SDS-PAGE, la acumulación de sHSP-P en plántulas de las líneas transgénicas 35S:A9 y sus correspondientes hermanas no transgénicas (NT), en condiciones normales de cultivo (**Figura r2A**). Así, observamos la acumulación de sHSP-P en las plántulas 35S:A9, que contrasta con la ausencia de dichas proteínas en las plántulas NT bajo condiciones normales de cultivo. Además, esta acumulación de proteínas sHSP-P en las líneas 35S:A9 fue considerablemente superior a la observada en las plántulas NT tras un tratamiento aclimatación al calor durante 3 h a 40 °C (**Figura r2A**, AC). Para confirmar que la activación de genes *shsp-P* forma parte de programa genético embrionario activado por el factor *HaHSFA9*, analizamos la acumulación de proteínas sHSP-P en semillas transgénicas de tabaco con sobreexpresión del factor *HaHSFA9* (líneas DS10:A9; **Figura r2B**) o con pérdida de función del factor HSFA9 endógeno (líneas DS10:A9M3; **Figura r2C**). Estas líneas presentan diferentes eventos de integración simple del correspondiente transgén (*DS10:HaHSFA9* o *DS10:A9M3*) en homocigosis, y han sido descritas previamente por Prieto-Dapena *et al.* (2006) y Tejedor-Cano *et al.* (2010), respectivamente. Comparamos cada línea transgénica con su correspondiente línea hermana NT. Las semillas maduras de las líneas DS10:A9, con ganancia de función del programa genético activado por *HaHSFA9*, mostraron consistentemente mayores niveles de acumulación de proteínas sHSP-P que sus hermanas NT (**Figura r2B**). Por el contrario, las semillas de las líneas DS10:A9M3, con pérdida de función del programa genético activado por el factor HSFA9 endógeno, redujeron considerablemente la acumulación de sHSP-P, en comparación con sus hermanas NT (**Figura r2C**). Estos resultados indican que durante la maduración de la semilla se activan genes *shsp-P* como parte del programa genético activado por el factor HSFA9.

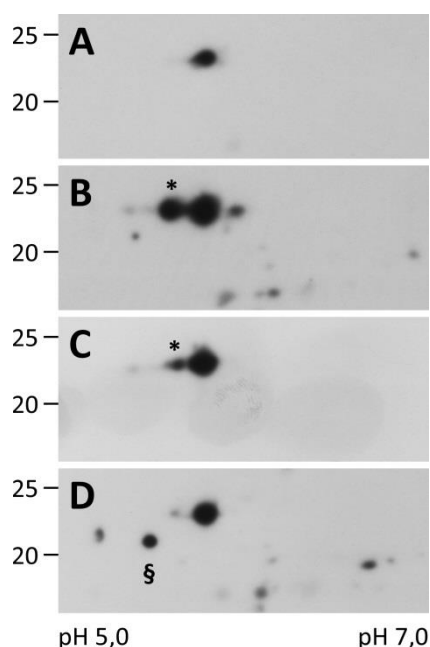
A continuación, comparamos por *western blot* tras electroforesis bidimensional (2D-PAGE) la acumulación de las distintas isoformas de los polipéptidos sHSP-P inducidos por el programa genético activado por *HaHSFA9*, comparándolo con el patrón de acumulación de proteínas sHSP-P inducidas durante la aclimatación al calor. Así, se detectaron principalmente dos polipéptidos sHSP-P, con pesos moleculares aparentes próximos a 22 KDa y puntos isoeléctricos ácidos



**Figura r2. Efectos de la ganancia y pérdida de función de HSFA9 sobre la acumulación de proteínas sHSP-P en semillas y plántulas.** Detección de la acumulación de proteínas de choque térmico sHSP-P, mediante *western blot* en electroforesis desnaturizante SDS-PAGE. **(A)** Acumulación de sHSP-P en plántulas de 3-4 semanas con ganancia de función de *HaHSFA9* (35S:A9). Se analizaron 3 líneas homocigóticas independientes 35S:A9 (A9<sub>1</sub>-A9<sub>3</sub>) y sus correspondientes líneas hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub>-NT<sub>3</sub>), así como una línea NT sometida a un tratamiento previo de aclimatación al calor durante 3h a 40°C (AC). **(B)** Acumulación de sHSP-P en semillas con ganancia de función de *HaHSFA9* (DS10:A9). Se analizaron 4 líneas homocigóticas independientes DS10:A9 (A9<sub>1</sub>-A9<sub>4</sub>) y sus correspondientes líneas hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub>-NT<sub>4</sub>). **(C)** Acumulación de sHSP-P en semillas con pérdida de función del factor HSFA9 endógeno (DS10:A9M3). Se analizaron 4 líneas homocigóticas independientes DS10:A9M3 (A9M3<sub>1</sub>-A9M3<sub>4</sub>) y sus correspondientes líneas hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub>-NT<sub>4</sub>). A la izquierda, se indican los marcadores de peso molecular (KDa).

( $pI \approx 5,6$  y  $5,8$ ) (**Figura r3**). En las semillas NT (**Figura r3A**), sólo detectamos la presencia de la isoforma de punto isoeléctrico menos ácido ( $pI \approx 5,8$ ). Sin embargo, en las semillas DS10:A9 se observó también la acumulación de la isoforma más ácida ( $pI \approx 5,6$ ) (**Figura r3B**). En las plántulas 35S:A9, bajo condiciones normales de cultivo, ambas isoformas se acumularon ectópicamente, predominando la isoforma menos ácida ( $pI \approx 5,8$ ) (**Figura r3C**). En las plántulas NT aclimatadas al calor durante 3 h a 40 °C, predominó la acumulación de la isoforma menos ácida ( $pI \approx 5,8$ ), aunque a niveles mucho más bajos que en las plántulas 35S:A9 (**Figura r3D**). Así, para obtener intensidades similares de este polipéptido en las plántulas NT aclimatadas al calor, se tuvieron que usar 10 veces más proteína total que la usada para la detección en las líneas 35S:A9. Además, se detectó la acumulación de un polipéptido de menor peso molecular aparente ( $\approx 21$  KDa) que se acumuló sólo en respuesta a tratamientos de aclimatación al calor (**Figura r3D**). Podemos concluir que las plántulas 35S:A9, en condiciones normales de cultivo, acumulan altos

niveles de las isoformas de polipéptidos sHSP-P presentes en semillas. Las sHSP-P que se inducen por calor difieren de las inducidas en semillas principalmente en abundancia, acumulándose a menores niveles y con distinto patrón de expresión al observado en las plántulas 35S:A9.



**Figura r3. Acumulación de polipéptidos sHSP-P en semillas y plántulas transgénicas de tabaco con sobreexpresión de *HaHSFA9*.** Comparación de la acumulación de proteínas de choque térmico sHSP-P mediante *western blot* tras electroforesis 2D-PAGE entre líneas que sobreexpresan *HaHSFA9* y sus correspondientes líneas hermanas no transgénicas. (A) Acumulación de sHSP-P en semillas no transgénicas. (B) Acumulación de sHSP-P en semillas DS10:A9. (C) Acumulación de sHSP-P en plántulas de 3-4 semanas 35S:A9. (D) Acumulación de sHSP-P en plántulas no transgénicas sometidas a un tratamiento previo de aclimatación al calor durante 3 h a 40 °C. Se muestran resultados representativos obtenidos con, al menos, 2 líneas independientes. Se indican las isoformas específicas de la sobreexpresión de *HaHSFA9* (\*) y de aclimatación al calor (§). A la izquierda, se indican los marcadores de peso molecular (kDa). En la parte inferior, se indica el rango de pH (pH 5,0-7,0).

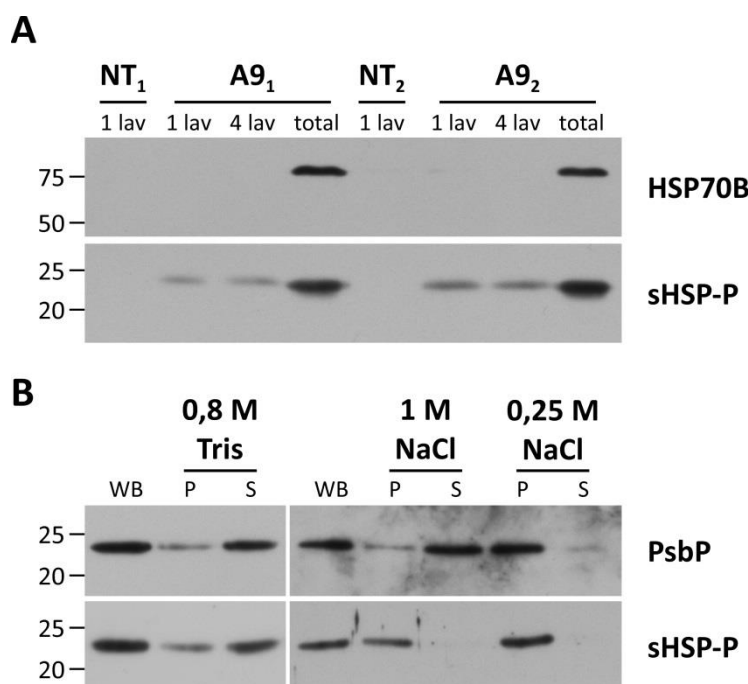
## 2.2. Asociación de las proteínas sHSP-P a las membranas tilacoidales en las plántulas 35S:A9 en condiciones normales de cultivo.

Una parte de las sHSP-P inducidas por calor en tejido vegetativo se encuentran asociadas a las membranas tilacoidales (Adamska & Kloppstech, 1991; Heckathorn *et al.*, 2002; Neta-Sharir *et al.*, 2005). Basándonos en estos precedentes, buscamos indicios de asociación a las membranas tilacoidales de las proteínas sHSP-P detectadas en las plántulas 35S:A9 bajo

condiciones normales de cultivo. Así, estudiamos por *western blot* tras electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE la presencia de sHSP-P en extractos de membranas tilacoidales (**Figura r4**). Para controlar la posible contaminación con proteínas del estroma, detectamos los niveles de acumulación de la proteína HSP70B. Observamos acumulación de la proteína HSP70B en las muestras correspondientes a extractos totales, mientras que no se detectó acumulación de HSP70B en las muestras de membranas tilacoidales (**Figura r4A**). De este modo se puede suponer una eliminación casi completa de las proteínas no asociadas a membrana, en los extractos de membranas tilacoidales. Sin embargo, la acumulación de proteínas sHSP-P se mantuvo constante durante los sucesivos lavados en las muestras correspondientes a membranas tilacoidales, y supuso un  $27,40 \pm 3,12$  % de la proteína sHSP-P presente en los extractos totales (**Figura r4A**). Estos resultados nos sugieren que aproximadamente el 25-30 % de las proteínas sHSP-P presentes en las plántulas 35S:A9 se encuentran asociadas a membranas tilacoidales bajo condiciones normales de cultivo.

La incubación de las membranas tilacoidales con diferentes soluciones salinas produce la liberación de algunas o todas las proteínas extrínsecas de membrana (Adamska & Kloppstech, 1991). Con el propósito de analizar la estabilidad de unión de las sHSP-P a las membranas tilacoidales, tratamos los extractos de membranas tilacoidales con soluciones salinas con diferente capacidad de solubilización, de menor a mayor: 0,25-1 M NaCl o 0,8 M Tris-HCl (pH 8,4) (**Figura r4B**). Como control, las membranas tilacoidales se trataron con el tampón de lavado (WB), usado para la preparación de los extractos (ver **Materiales y métodos**). Posteriormente, separamos por centrifugación la proteína solubilizada del resto de membrana tilacoidal, y detectamos por *western blot* tras electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE el reparto de sHSP-P entre la fracción soluble (correspondiente a la proteína solubilizada) y la fracción no soluble (proteína asociada a la membrana tilacoidal). La solubilización de las sHSP-P se comparó con la observada para la proteína PsbP, una proteína del PSII con asociación luminal extrínseca. Las proteínas sHSP-P no se solubilizaron con NaCl, independientemente de la concentración usada. Sin embargo, la solubilización de la proteína PsbP aumentó con la concentración de NaCl. Tras tratamientos con 0,25 M NaCl no se solubiliaron ninguna de las dos proteínas. Mientras que aproximadamente el 80 % de la proteína PsbP unida a la membrana tilacoidal se solubilizó tras tratamientos con 1 M NaCl o 0,8 M Tris-HCl (pH 8,4). Por el contrario, tras el tratamiento con 1 M NaCl sólo se solubilizó aproximadamente un 5 % de las sHSP-P unidas a las membranas tilacoidales. Las proteínas sHSP-P sólo se solubiliaron tras tratamientos con 0,8 M Tris-HCl (pH

8,4), con una solubilización similar a la observada para la proteína PsbP para estas condiciones de solubilización. Estos resultados nos permiten deducir que las sHSP-P inducidas por el factor *HaHSFA9* en las plántulas 35S:A9 muestran, bajo condiciones normales de crecimiento, una unión a membranas tilacoidales de fuerza similar, aunque de naturaleza menos electrostática que la observada para la proteína PsbP.



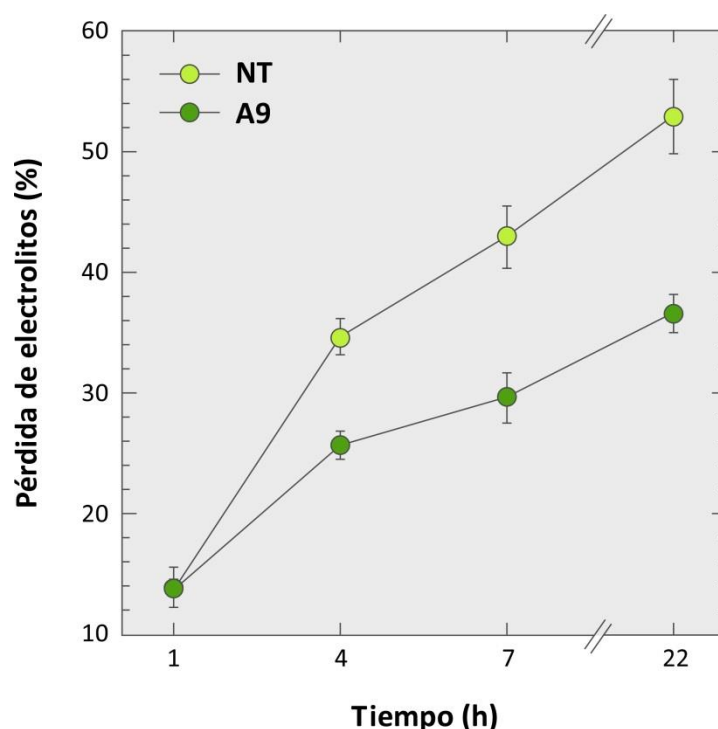
**Figura r4. Asociación de sHSP-P a las membranas tilacoidales en las plántulas 35S:A9 bajo condiciones normales de cultivo.** Detección de las proteínas sHSP-P, PsbP y HSP70B en membranas tilacoidales mediante *western blot* tras electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE. Se analizaron plántulas de 3-4 semanas de 3 líneas homocigóticas independientes 35S:A9 (A9<sub>1</sub>, A9<sub>2</sub> y A9<sub>3</sub>) y sus correspondientes líneas hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub>, NT<sub>2</sub> y NT<sub>3</sub>). **(A)** Comparación de la acumulación de sHSP-P y HSP70B en extractos de proteínas de plántulas enteras (total) y en preparaciones de tilacoides tras un lavado (1 lav) o cuatro lavados (4 lav), en las plántulas 35S:A9. Se muestran resultados representativos correspondientes a 2 líneas 35S:A9 (A9<sub>1</sub> y A9<sub>2</sub>) y sus correspondientes líneas hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub> y NT<sub>2</sub>). **(B)** Comparación de la acumulación de sHSP-P y PsbP entre la fracción soluble (S) y la fracción no soluble (P) tras tratamientos con 0,25 M NaCl, 1 M NaCl o 0,8 M Tris-HCl, pH 8,4, durante 60 min a 25 °C. Se muestran resultados representativos obtenidos con, al menos, 2 líneas independientes 35S:A9. Cantidades de proteínas correspondientes a 2 mg de clorofila por carril. A la izquierda, se indican los marcadores de peso molecular (KDa). A la derecha se indica el anticuerpo específico usado para la detección de cada proteína.

### 3. El programa genético activado por el factor *HaHSFA9* mejora la estabilidad de las membranas celulares en las plántulas 35S:A9.

La estabilización de las membranas celulares es esencial para la tolerancia de la planta frente a la desecación (Hoekstra *et al.*, 2001). Está ampliamente descrito que las sHSP interaccionan con las distintas membranas celulares, estabilizándolas y protegiéndolas frente a determinadas condiciones de estrés (Nakamoto & Vigh, 2007). La acumulación de proteínas sHSP, tanto de localización citosólica (sHSP-CI y sHSP-CII) como plastidial (sHSP-P), inducida por la sobreexpresión ectópica de *HaHSFA9*, podría mejorar la estabilidad de las membranas celulares, contribuyendo a la tolerancia de las plántulas 35S:A9 a la deshidratación severa. La estabilidad de las membranas celulares puede estimarse mediante la cuantificación de la liberación de electrolitos al medio (ver por ejemplo Beckett, 2001 y Liu *et al.*, 2006). Para ello, estudiamos la pérdida de electrolitos en plántulas 35S:A9 y NT (**Figura r5**). Tras 1 h de tratamiento, no se observaron diferencias en la pérdida de electrolitos entre las plántulas 35S:A9 y NT ( $13,68 \pm 1,63$  % y  $13,68 \pm 0,66$  %, respectivamente). Sin embargo, a medida que avanzó el tratamiento, las plántulas 35S:A9 mostraron menor pérdida de electrolitos, en comparación con las plántulas NT. Así, al final del tratamiento (22 h), la pérdida de electrolitos en las plántulas NT alcanzó el  $52,94 \pm 3,08$  %, mientras que en las plántulas 35S:A9 sólo llegó al  $36,61 \pm 1,56$  %. Esta reducción de la pérdida de electrolitos en las plántulas 35S:A9, en comparación con las plántulas NT tras 22 h de tratamiento, es estadísticamente significativa ( $F=22,37$ ;  $P=0,0008$ ). Estos resultados indican una mayor estabilidad de las membranas celulares en las plántulas 35S:A9.

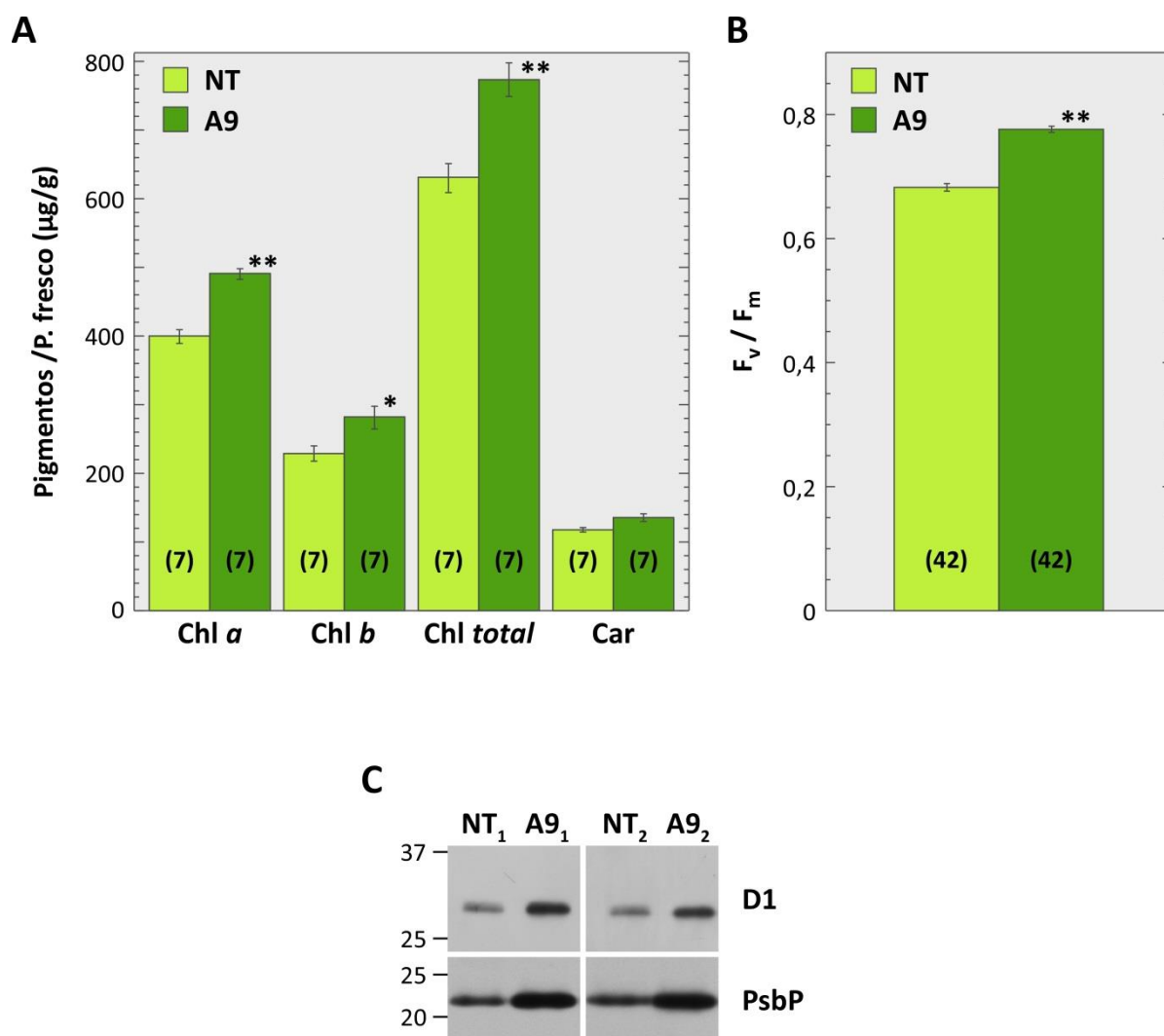
### 4. Efectos positivos del programa genético activado por el factor *HaHSFA9* sobre la maquinaria fotosintética de las plántulas 35S:A9 en condiciones normales de cultivo.

La unión de las proteínas sHSP-P a las membranas tilacoidales, observada en las plántulas 35S:A9 bajo condiciones normales de cultivo (ver **Figura r4A**), podría contribuir a la estabilización de las membranas tilacoidales y sus componentes (Lee *et al.*, 2000; Nakamoto *et al.*, 2000; Nakamoto & Vigh, 2007). Esto nos llevó a estudiar si la sobreexpresión del factor *HaHSFA9* en plántulas de tabaco afecta a la maquinaria fotosintética en condiciones normales de cultivo. En primer lugar, cuantificamos la acumulación de pigmentos fotosintéticos, en las plántulas 35S:A9 y NT, bajo condiciones normales de cultivo (**Figura r6A**). Las plántulas 35S:A9 acumularon de



**Figura r5. Menor pérdida de electrolitos en las plántulas 35S:A9.** Comparación de la pérdida de electrolitos entre las plántulas 35S:A9 (A9) y sus hermanas no transgénicas (NT), cultivadas en condiciones normales de crecimiento. Se representan los porcentajes promedio de pérdida de electrolitos en agua desionizada (MiliQ) a diferentes tiempos entre 1 y 22 h: 1 h (n=9); 4 h (n=9); 7 h (n=6) y 22 h (n=6). Datos correspondientes a 2-3 experimentos independientes, con plántulas de 3-4 semanas de 3 líneas homocigóticas independientes 35S:A9 (A9<sub>1</sub>-A9<sub>3</sub>) y sus correspondientes líneas hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub>-NT<sub>3</sub>).

forma consistente mayor cantidad de clorofila total que sus hermanas NT ( $773,9 \pm 23,8$  y  $630,9 \pm 21,0$   $\mu\text{g Ch/g P. fresco}$ , respectivamente). Esta mayor acumulación de clorofila en las plántulas 35S:A9, en comparación con las plántulas NT, es estadísticamente significativa ( $F=49,64$ ;  $P=0,001$ ), y se debió al aumento tanto de clorofila *a* como de clorofila *b*. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en la acumulación de carotenos entre las líneas 35S:A9 y NT ( $F=0,638$ ;  $P=0,4285$ ). La medida del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ), permite estimar la eficiencia máxima con la que el PSII usa la luz absorbida para reducir a la quinona  $Q_A$  (Baker, 2008). Mediante esta técnica, analizamos la integridad del PSII en las plántulas 35S:A9 y sus correspondientes hermanas NT, bajo condiciones normales de cultivo (**Figura r6B**). Las plántulas 35S:A9 mostraron de forma consistente mayor  $F_v/F_m$  que las plántulas NT ( $F_v/F_m = 0,792 \pm 0,002$  y  $0,697 \pm 0,004$ , respectivamente). Este mayor valor de  $F_v/F_m$  en las plántulas 35S:A9, en comparación con las plántulas NT, es estadísticamente significativo ( $F=405,05$ ;  $P=0,0001$ ), e



**Figura r6. Mejora de la maquinaria fotosintética en las plántulas 35S:A9 bajo condiciones normales de cultivo.** Comparación entre las plántulas 35S:A9 (A9) y sus hermanas no transgénicas (NT). **(A)** Cuantificación del contenido en pigmentos fotosintéticos: clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), clorofila total (Chl total) y carotenos (Car). Se representa el contenido en pigmentos fotosintéticos (µg) en relación al peso fresco (g). **(B)** Rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ). **(C)** Detección mediante *western blot* tras electroforesis desnaturizante SDS-PAGE de la acumulación de las proteínas del PSII: D1 y PsbP. Se muestran resultados representativos correspondientes a 2 líneas 35S:A9 (A9<sub>1</sub> y A9<sub>2</sub>) y sus correspondientes líneas hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub> y NT<sub>2</sub>). A la izquierda, se indican los marcadores de peso molecular (kDa). A la derecha se indica el anticuerpo específico usado para la detección de cada proteína. Datos correspondientes a 2-3 experimentos, con plántulas de 3-4 semanas de 3 líneas homocigóticas independientes 35S:A9 (A9<sub>1</sub>-A9<sub>3</sub>) y sus correspondientes líneas hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub>-NT<sub>3</sub>). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas:  $P=0,01$  (\*) y  $P=0,001$  (\*\*). Entre paréntesis se indica el número de medidas correspondiente a cada valor promedio.



indica una mayor integridad del PSII en las plántulas 35S:A9, en condiciones normales de cultivo. Estos resultados nos llevaron a analizar adicionalmente al PSII, considerado como uno de los componentes del aparato fotosintético con mayor susceptibilidad al daño causado por el estrés (Allakhverdiev *et al.*, 2008). Así, analizamos por *western blot* tras electroforesis desnaturizante SDS-PAGE la acumulación de las proteínas D1 (PsbA) y PsbP, en las plántulas 35S:A9 y NT, bajo condiciones normales de cultivo (**Figura r6C**). La proteína D1 está caracterizada como el componente proteico más lábil del RC del PSII (Aro *et al.*, 1993; Nixon *et al.*, 2010; Takahashi & Badger, 2011). La proteína PsbP, es necesaria para el ensamblaje y la estabilidad del PSII (Xiaoping *et al.*, 2007). Las plántulas 35S:A9 mostraron mayor acumulación de ambas proteínas del PSII (D1 y PsbP) que sus correspondientes hermanas NT, en condiciones normales de cultivo. Estos resultados indican que la sobreexpresión ectópica de *HaHSFA9* en las plántulas 35S:A9 tendría amplios efectos positivos sobre la maquinaria fotosintética en condiciones normales de cultivo, particularmente sobre el PSII.

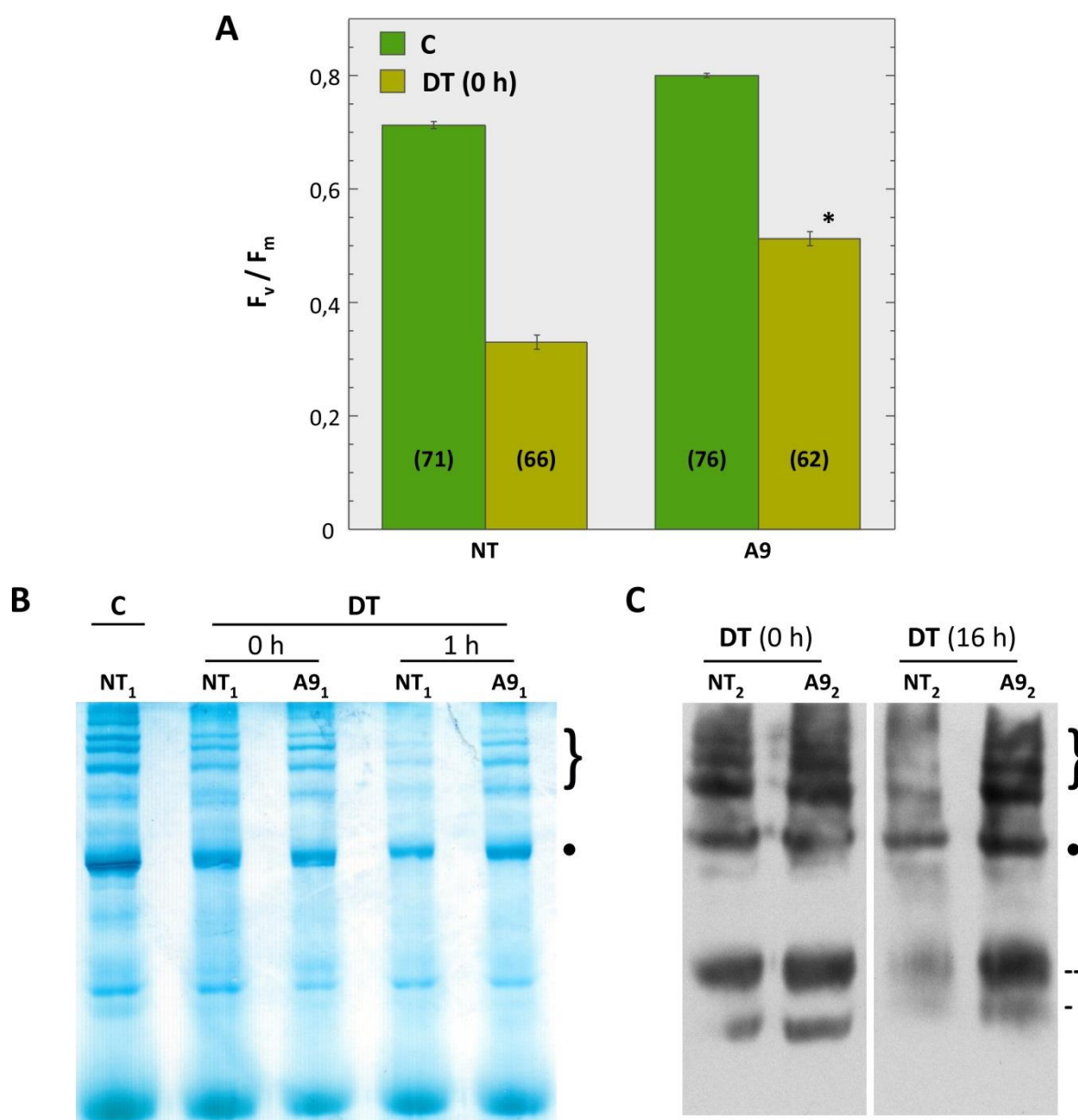
### **5. El programa genético activado por el factor *HaHSFA9* protege al aparato fotosintético frente a deshidratación severa en las plántulas 35S:A9.**

El PSII se ha caracterizado como un sitio crítico de daño por condiciones de estrés como la deshidratación, calor, alta luminosidad o luz UV-B (Allakhverdiev *et al.*, 2008). Sin embargo, en comparación con el PSII, el PSI generalmente es más resistente a daño por estrés. Los resultados mostrados previamente indican que la sobreexpresión ectópica del factor *HaHSFA9* en plántulas de tabaco aumenta la estabilidad de las membranas celulares y mejora la maquinaria fotosintética, especialmente del PSII, en condiciones normales de cultivo. Estos resultados, unidos a la tolerancia de las plántulas 35S:A9 a tratamientos de deshidratación severa (Prieto-Dapena *et al.*, 2008), sugieren una protección del aparato fotosintético frente a las condiciones de deshidratación severa usadas experimentalmente.

En primer lugar, analizamos cómo afectó la deshidratación severa al rendimiento cuántico máximo del PSII en las plántulas de 3-4 semanas 35S:A9 y sus hermanas NT (**Figura r7A**). Los ensayos de deshidratación DT2 descritos por Prieto-Dapena *et al.* (2008) se realizan usualmente sobre papel de aluminio, el cual podría interferir en la medida de la fluorescencia de la clorofila para la determinación de  $F_v/F_m$ . Esto nos llevó a modificar los ensayos DT2, realizando la deshidratación de las plántulas sobre portaobjetos de vidrio. De esta forma, obtuvimos pérdidas

de agua de aproximadamente el 95-96 % contenido inicial de agua en la plántula (correspondientes a potenciales hídricos ( $\phi$ ) entre -15 y -25 MPa). Inmediatamente tras los ensayos de deshidratación DT2, las plántulas 35S:A9 mostraron mayor  $F_v/F_m$  que sus hermanas NT ( $F_v/F_m=0,513 \pm 0,012$  y  $0,330 \pm 0,013$ , respectivamente). Si comparamos estos resultados con los valores obtenidos en condiciones normales de cultivo, observamos que tras la deshidratación, el valor de  $F_v/F_m$  en las plántulas 35S:A9 se redujo al 63,99 % del valor inicial, mientras que en las plántulas NT se redujo al 46,22 % del valor de  $F_v/F_m$  inicial. Esta diferencia es estadísticamente significativa ( $F=194,41$ ;  $P=0,0001$ ), y demuestra una mayor integridad del PSII de las plántulas 35S:A9 tras la deshidratación que en las plántulas NT.

Además, analizamos por electroforesis de proteínas en estado nativo los complejos tilacoidales proteína-clorofila del PSII tras los tratamientos de deshidratación DT2. Para ello, solubilizamos las membranas tilacoidales con  $\beta$ -dodecil-n-maltósido y separamos los complejos proteína-clorofila en geles *Blue-Native*. Identificamos los complejos del PSII por comparación con el patrón de movilidad descrito en la literatura para estos complejos en geles *Blue-Native* (ver por ejemplo Lundin *et al.*, 2008; Armbruster *et al.*, 2010; García-Cerdán *et al.*, 2011). Así, identificamos el PSII en forma de monómeros, dímeros o en forma de supercomplejos de dímeros asociados a proteínas del LHC (**Figura r7B**). Todos los complejos persistieron inmediatamente tras los tratamientos DT2, sin observarse diferencias entre las plántulas NT y 35S:A9 (**Figura r7B**, muestras DT 0 h). Sin embargo, después de 1 hora de rehidratación tras el ensayo DT2, la mayoría de los complejos del PSII desaparecieron en las plántulas NT, mientras que se conservaron en las plántulas 35S:A9 (**Figura r7B**, muestras DT 1 h). Posteriormente, detectamos la proteína D1 del PSII en los geles *Blue-Native*, mediante *western blot* (**Figura r7C**). Esto nos permitió detectar los dímeros y supercomplejos del PSII, así como los complejos parcialmente ensamblados CV (monómeros del PSII) y CVII (monómeros del PSII sin la proteína CP43) (Lundin *et al.*, 2008). Observamos que, inmediatamente tras los tratamientos de deshidratación severa, los complejos del PSII persistieron por igual en las plántulas 35S:A9 y NT (**Figura r7C**, muestras DT 0 h). Sin embargo, después de 16 h de rehidratación tras los tratamientos DT2, los supercomplejos del PSII, así como el complejo parcialmente desensamblado CV, resistieron mejor en las plántulas 35S:A9 que en las NT, (**Figura r7C**, muestras DT 16 h). Podemos atribuir la falta de efectos inmediatamente tras el tratamiento DT2 a las rápidas condiciones de deshidratación. Así, la pérdida de agua de forma rápida y drástica,



**Figura r7. Protección del PSII frente al daño producido por deshidratación severa en las plántulas 35S:A9.** Comparación de la integridad de los complejos del PSII entre las plántulas de 3-4 semanas 35S:A9 (A9) y sus hermanas no transgénicas (NT), tras tratamientos de deshidratación severa DT2 (DT). Resultados observados bajo condiciones normales crecimiento (C), inmediatamente tras el tratamiento de deshidratación (0 h) o tras un periodo de rehidratación de 1 o 16 h. **(A)** Rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ). El asterisco (\*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre A9 y NT ( $F=194,41$ ;  $P=0,0001$ ). Datos correspondientes a 5 experimentos independientes y 2-3 repeticiones por experimento, con 2 líneas homocigóticas independientes 35S:A9 (A9<sub>1</sub> y A9<sub>2</sub>) y sus correspondientes líneas hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub> y NT<sub>2</sub>). Entre paréntesis se indica el número de medidas correspondiente a cada valor promedio. **(B)** Visualización de los complejos del PSII mediante geles *Blue-Native*. El gel se tiñó con *Coomassie Blue*. Se muestran resultados representativos obtenidos con 2 líneas independientes 35S:A9. **(C)** Detección mediante *western blot* en geles *Blue-Native* de la proteína D1. El punto (•) y el corchete (}) indican la posición de los dímeros del PSII y los supercomplejos PSII-LHC, respectivamente. Los guiones simple (-) y doble (--) indican los monómeros CV y CVII del PSII, respectivamente. Se muestran resultados representativos obtenidos con 2 líneas independientes 35S:A9 y sus correspondientes líneas hermanas NT.

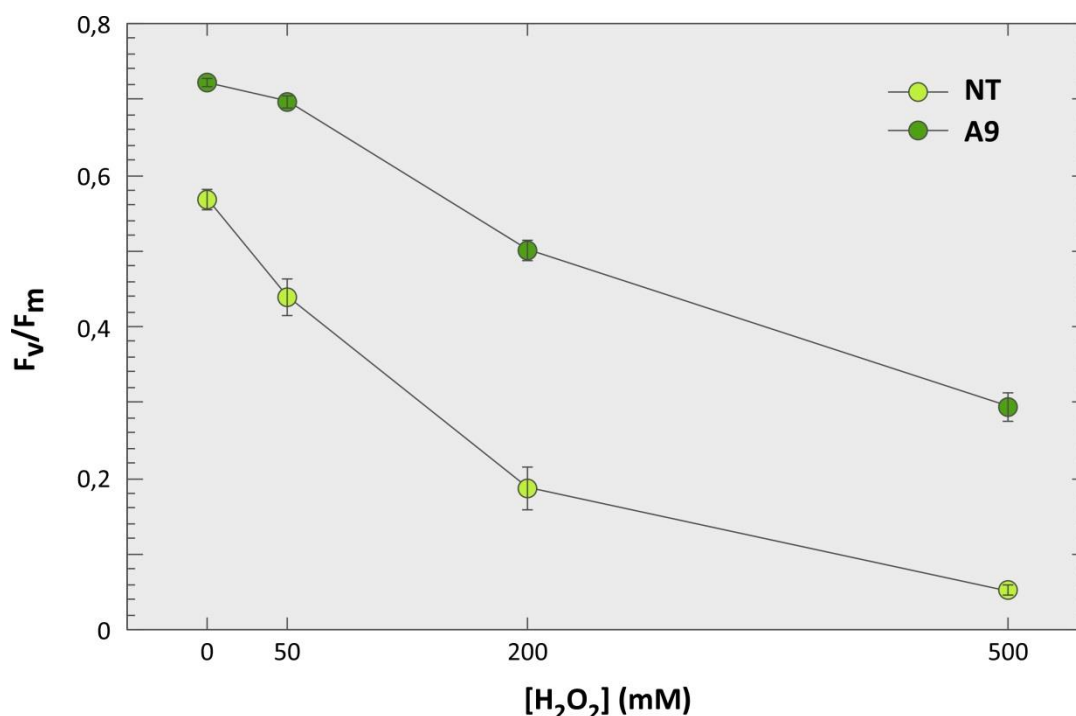
usada en los ensayos de deshidratación, impediría el desmantelamiento inmediato de los complejos dañados en las líneas NT. Estos resultados indican que la sobreexpresión ectópica del factor *HaHSFA9* en plántulas de tabaco protege la integridad del PSII frente al daño producido por la deshidratación severa.

### 6. El programa genético activado por el factor *HaHSFA9* protege al aparato fotosintético frente a estrés oxidativo severo.

Los resultados anteriores mostraron la protección del aparato fotosintético en las plántulas 35S:A9 frente a tratamientos de deshidratación severa. Los precedentes en la literatura muestran que el daño producido por la deshidratación provoca el desmantelamiento de las membranas y la oxidación de los componentes celulares por ROS, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), los radicales hidroxilos y los radicales superóxidos (Dinakar *et al.*, 2012). El aparato fotosintético, en especial el PSII, es muy sensible a daños por estrés oxidativo (Allakhverdiev *et al.*, 2008). Entre los componentes intrínsecos del PSII, la proteína D1, es particularmente vulnerable al daño producido por ROS (Aro *et al.*, 1993; Nixon *et al.*, 2010). Esto nos llevó a estudiar la posible tolerancia de las plántulas 35S:A9 a tratamientos de estrés oxidativo usando altas concentraciones de  $H_2O_2$ , así como la posible protección del aparato fotosintético frente al daño oxidativo causado por dichos tratamientos.

En primer lugar, realizamos experimentos exploratorios con distintas concentraciones de  $H_2O_2$ , para encontrar la concentración óptima de estudio. Para ello, tratamos las plántulas 35S:A9 y NT con concentraciones entre 50 y 500 mM  $H_2O_2$  durante 24 h en oscuridad. Posteriormente, analizamos la tolerancia a los tratamientos mediante la medida de  $F_v/F_m$  (Figura r8). Observamos que los tratamientos con 50 mM  $H_2O_2$  fueron demasiado leves, y no afectaron al valor de  $F_v/F_m$  en las líneas 35S:A9 ( $F_v/F_m=0,699 \pm 0,009$ ), mientras que en las plántulas NT se redujo ligeramente con respecto a las medidas en los tratamientos control ( $F_v/F_m=0,440 \pm 0,024$ ). Por el contrario, los tratamientos con 500 mM  $H_2O_2$  afectaron drásticamente tanto a las plántulas 35S:A9 ( $F_v/F_m=0,296 \pm 0,019$ ) como a las NT ( $F_v/F_m=0,052 \pm 0,007$ ), en las cuales se redujo prácticamente a cero el valor de  $F_v/F_m$ . Sin embargo, tratamientos intermedios con 200 mM  $H_2O_2$ , permitieron observar mejor las diferencias entre las líneas 35S:A9 y NT ( $F_v/F_m=0,502 \pm 0,014$  y  $0,187 \pm 0,028$ , respectivamente). De este modo, seleccionamos los tratamientos con 200

mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  para estudiar la tolerancia de las líneas 35S:A9 a condiciones extremas de estrés oxidativo.



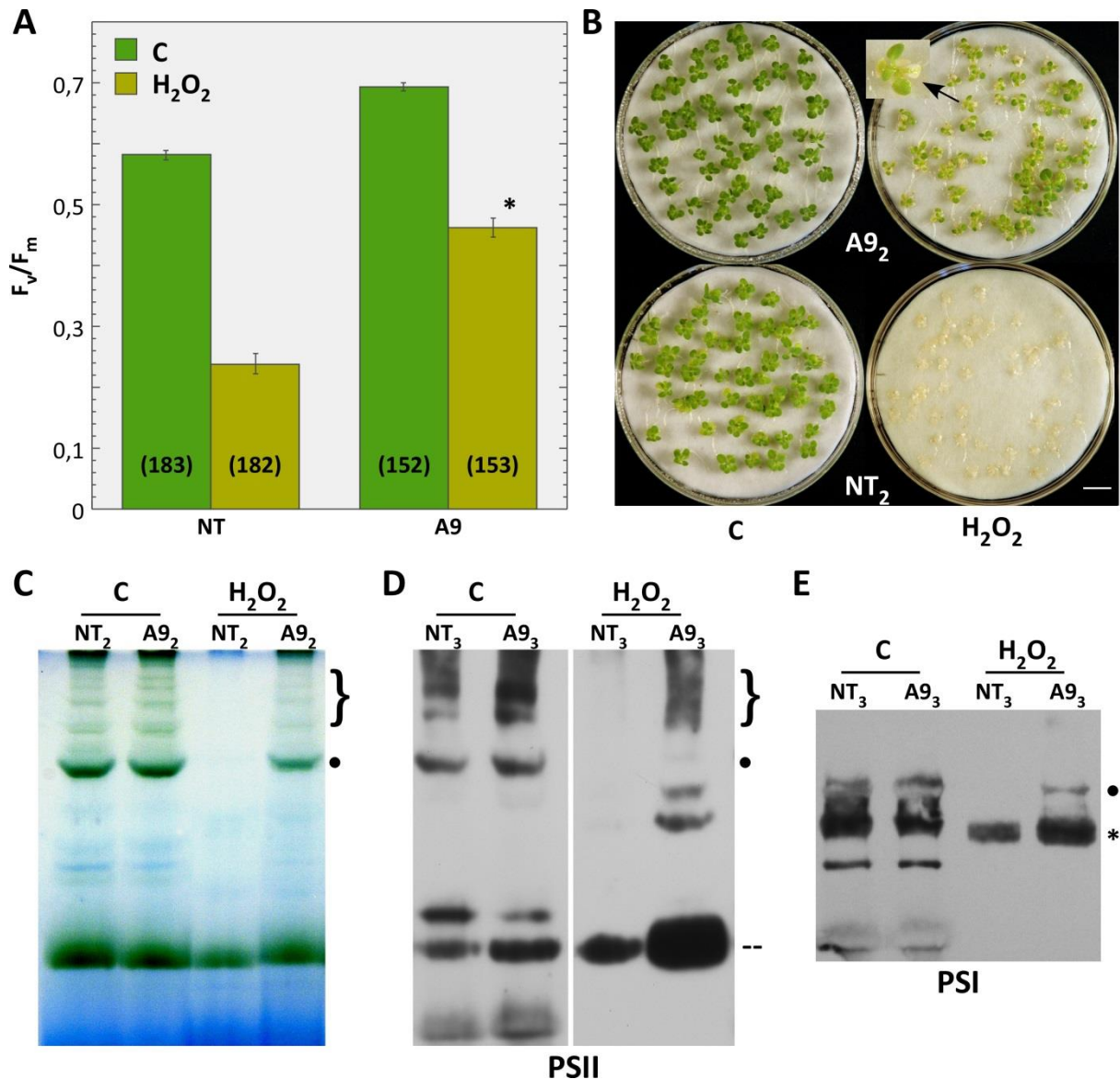
**Figura r8. Efectos del  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre el rendimiento cuántico máximo del PSII en las plántulas 35S:A9.** Comparación del rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ) entre las plántulas de 3-4 semanas 35S:A9 (A9) y sus hermanas no transgénicas (NT), tras tratamientos con distintas concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , entre 0 y 500mM: 0mM (n=42); 50mM (n=24); 200mM (n=30) y 500mM (n=42). Datos correspondientes a 2 experimentos independientes y 1-2 repeticiones por experimento, con 3 líneas homocigóticas independientes 35S:A9 (A9<sub>1</sub>, A9<sub>2</sub> y A9<sub>3</sub>) y sus correspondientes líneas hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub>, NT<sub>2</sub> y NT<sub>3</sub>).

Las plántulas 35S:A9, así como sus respectivas hermanas NT, se trataron con 200 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , durante 24 h en oscuridad. Tras el tratamiento, se eliminó completamente el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , y se dejaron recuperar las plántulas durante un periodo máximo de 7 días (Figura r9). Inmediatamente tras los tratamientos con 200 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se analizó la integridad del PSII mediante la medida de  $F_v/F_m$  (Figura r9A). Las plántulas 35S:A9 mostraron mayor  $F_v/F_m$  que sus hermanas NT ( $F_v/F_m = 0,470 \pm 0,012$  y  $0,229 \pm 0,015$ , respectivamente). Si comparamos estos valores con los obtenidos en los tratamientos control, observamos que tras los tratamientos con 200 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $F_v/F_m$  se redujo en las plántulas 35S:A9 al 67,72 % del valor en condiciones control, mientras que en las plántulas NT se redujo al 39,61 % del valor de  $F_v/F_m$  en condiciones control. Esta diferencia es estadísticamente significativa ( $F=265,58$ ;  $P=0,0001$ ), y demuestra que el PSII mantiene mayor

integridad en las plántulas 35S:A9 tras la deshidratación que en las líneas NT. Además, analizamos la supervivencia de las plántulas después de 7 días de recuperación tras el tratamiento con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (**Figura r9B**). Prácticamente la totalidad de las plántulas 35S:A9 sobrevivieron tras el tratamiento con 200 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , mientras que las plántulas NT murieron en su totalidad. Las plántulas 35S:A9 supervivientes conservaron vivos los órganos fotosintéticos (hojas y tallo), excepto los cotiledones, mientras que las plántulas NT se despigmentaron y no sobrevivieron (**Figura r9B**).

Estos resultados muestran la protección de los órganos vegetativos y la integridad del aparato fotosintético en las plantas 35S:A9, frente a condiciones muy severas de estrés oxidativo. Para confirmar la integridad del aparato fotosintético tras los tratamientos de estrés oxidativo severo, analizamos por electroforesis de proteínas en estado nativo los complejos tilacoidales proteína-clorofila del PSII (**Figura r9C**). Las membranas tilacoidales se solubilizaron con  $\beta$ -dodecil-n-maltósido y se separaron los complejos proteína-clorofila en geles *Blue-Native*. Así, observamos que los tratamientos con 200 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  destruyeron los complejos proteína-clorofila del PSII en las plántulas NT, mientras que en las plántulas 35S:A9 resistieron algunos de estos complejos. La desaparición de los complejos del PSII tras los tratamientos con  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue más drástica que la observada para los tratamientos de deshidratación DT2 (ver **Figura r7B**, muestra DT 1h). En ambos casos, se observó mayor protección de los complejos del PSII en las plántulas 35S:A9, principalmente de los supercomplejos PSII-LHC. Además, estudiamos la integridad del PSII y el PSI tras los tratamientos con 200 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  mediante el análisis por *western blot* en geles *Blue-Native*, usando anticuerpos específicos frente a las proteínas D1 y PsaB, componentes del RC del PSII y el PSI, respectivamente (**Figura r9D y E**). Al igual que en el caso de los tratamientos de deshidratación DT2 (ver **Figura r7C**) la proteína D1 nos permitió detectar los dímeros, supercomplejos y complejos parcialmente ensamblados CV y CVII del PSII (**Figura r9D**). De igual modo, con el anticuerpo frente la proteína PsaB detectamos el PSI en forma de monómeros y del supercomplejo PSI-LHCI (**Figura r9E**). Bajo tratamientos control, la detección de los complejos del PSII y el PSI fue similar entre las líneas 35S:A9 y NT (**Figura r9D y E**, muestras C). Tras tratamientos con 200 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , se destruyeron la mayoría de los complejos del PSII y el PSI en las líneas NT, y sólo resistieron parte de los monómeros del PSI y los complejos CVII del PSII. En las líneas 35S:A9, sin embargo, los complejos totalmente ensamblados del PSII y el supercomplejo PSI-LHCI resistieron a los tratamientos con 200 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (**Figura r9D y E**, muestras  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Además, también se observó que los complejos parcialmente ensamblados del PSII, principalmente el complejo CVII, se acumularon a mayores





**Figura r9. Protección del PSII y el PSI frente al daño oxidativo en las plántulas 35S:A9.** Comparación de la estabilidad del PSII y el PSI entre las plántulas 35S:A9 (A9) y sus hermanas no transgénicas (NT), tras un tratamiento con 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) o H<sub>2</sub>O (C), durante 24 h en oscuridad. **(A)** Rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ), inmediatamente tras el tratamiento. Datos correspondientes a 10 experimentos independientes y 1-2 repeticiones por experimento, con 3 líneas homocigóticas independientes 35S:A9 (A9<sub>1</sub>, A9<sub>2</sub> y A9<sub>3</sub>) y sus correspondientes líneas hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub>, NT<sub>2</sub> y NT<sub>3</sub>). Entre paréntesis se indica el número de medidas correspondiente a cada valor promedio. El asterisco (\*) indica una diferencia estadísticamente significativa entre A9 y NT tras los tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $F=265,58$ ;  $P=0,0001$ ). **(B)** Resultados representativos de la supervivencia de las plántulas tras los tratamientos con 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Fotografías tomadas después de 7 días de recuperación tras los tratamientos. La barra de escala equivale a 1 cm. **(C)** Visualización de los complejos proteicos de membrana del PSII mediante geles *Blue-Native*. **(D)** Detección mediante *western blot* en geles *Blue-Native* de la proteína D1 del PSII. El punto (•) y el corchete (}) indican la posición de los dímeros del PSII y los supercomplejos PSII-LHC, respectivamente. El guión doble (--) indica el monómero CVII del PSII. **(E)** Detección mediante *western blot* en geles *Blue-Native* de la proteína PsaB del PSI. El punto (•) indica la posición del supercomplejo PSI-LHCI. El asterisco (\*) indica el monómero del PSI. Se muestran resultados representativos obtenidos con, al menos, 2 líneas independientes 35S:A9 y sus correspondientes líneas hermanas NT.

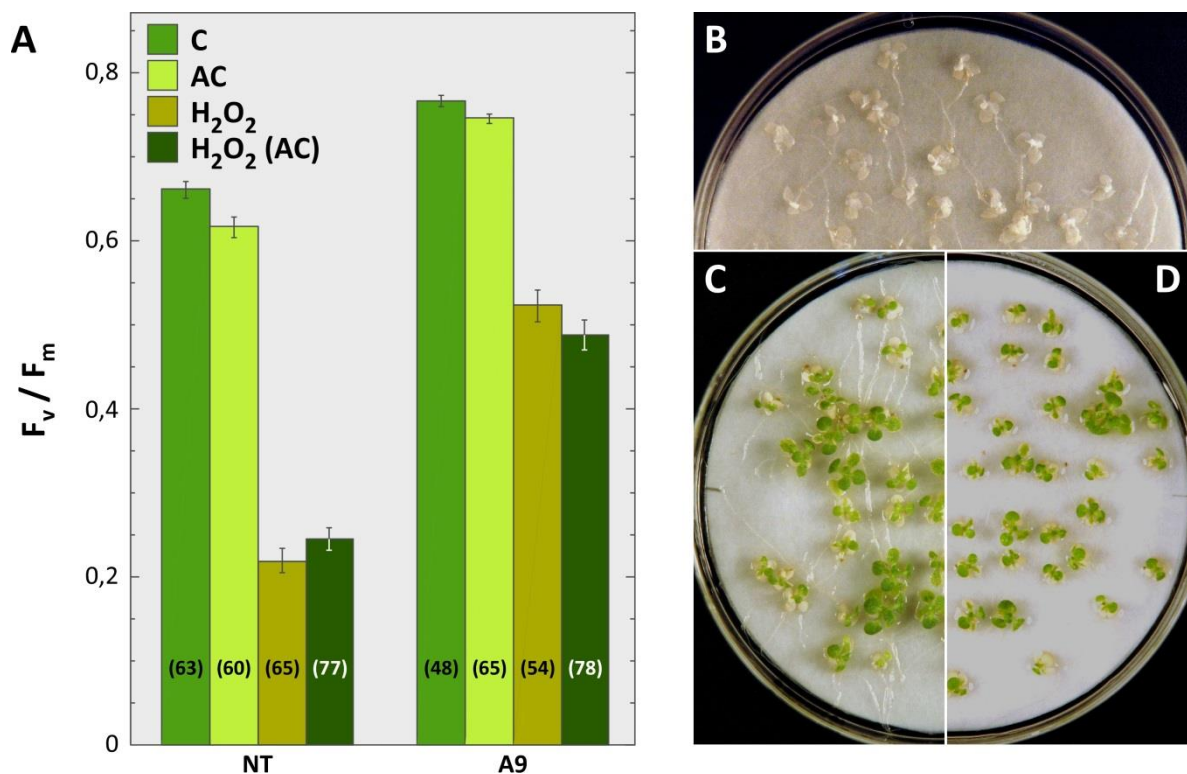
niveles en las plantas 35S:A9 que en las NT tras el estrés. Estos resultados, demuestran que la sobreexpresión ectópica del factor *HaHSFA9* en plántulas de tabaco protege la integridad estructural tanto del PSII como del PSI frente a condiciones muy drásticas de estrés oxidativo.

### 7. La aclimatación al calor no confiere resistencia a estrés oxidativo extremo a las plántulas no transgénicas.

El programa genético activado por el factor *HaHSFA9* induce la acumulación ectópica de distintas proteínas HSP. Algunas de estas HSP también se acumulan en plántulas no transgénicas (NT) tras una aclimatación al calor durante 3 h a 40 °C (Prieto-Dapena *et al.*, 2008). En trabajos previos de nuestro laboratorio (Prieto-Dapena *et al.*, 2008), se demostró que la aclimatación al calor no confería tolerancia a deshidratación severa. Así, las plántulas NT previamente aclimatadas al calor, sobrevivían a tratamientos con altas temperaturas de 2,5 h a 50 °C, pero no eran capaces de sobrevivir a tratamientos de deshidratación severa. Por el contrario, las plántulas 35S:A9, capaces de tolerar los tratamientos de deshidratación severa, no sobrevivían a tratamientos con altas temperaturas de 2,5 h a 50 °C, a menos que se les sometiera previamente a tratamientos de aclimatación al calor, durante 3 h a 40 °C (Prieto-Dapena *et al.*, 2008). Estos precedentes nos llevaron a estudiar si estas mismas observaciones son aplicables a la tolerancia frente a los tratamientos de estrés oxidativo severo usados en nuestro estudio. Con este propósito, las plántulas 35S:A9 y NT, con o sin aclimatación al calor previa durante 3 h a 40 °C, se trataron con 200mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24h en oscuridad. Tras los tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se compararon los efectos sobre la supervivencia y la integridad del PSII entre las plántulas aclimatadas y no aclimatadas previamente al calor. (Figura r10). Así, observamos que la aclimatación al calor no impide la disminución de  $F_v/F_m$  observada en las plántulas NT tras tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $F=1,94$ ;  $P=0,16$ ), ni mejora la protección frente al tratamiento en las plántulas 35S:A9 ( $F=3,32$ ;  $P=0,07$ ) (Figura r10A). Además, las plántulas NT previamente aclimatadas al calor tampoco sobrevivieron a los tratamientos con 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura r10B). Por el contrario, las plántulas 35S:A9 sobrevivieron a los tratamientos con 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tanto aclimatadas como sin aclimatar (Figura r10C y D, respectivamente). Estos resultados nos permiten inferir que el programa genético activado en tejido vegetativo por calor no es suficiente para conferir resistencia a las condiciones de estrés oxidativo severo usadas en nuestro trabajo. Sin embargo, estas condiciones de estrés oxidativo severo sí son toleradas por



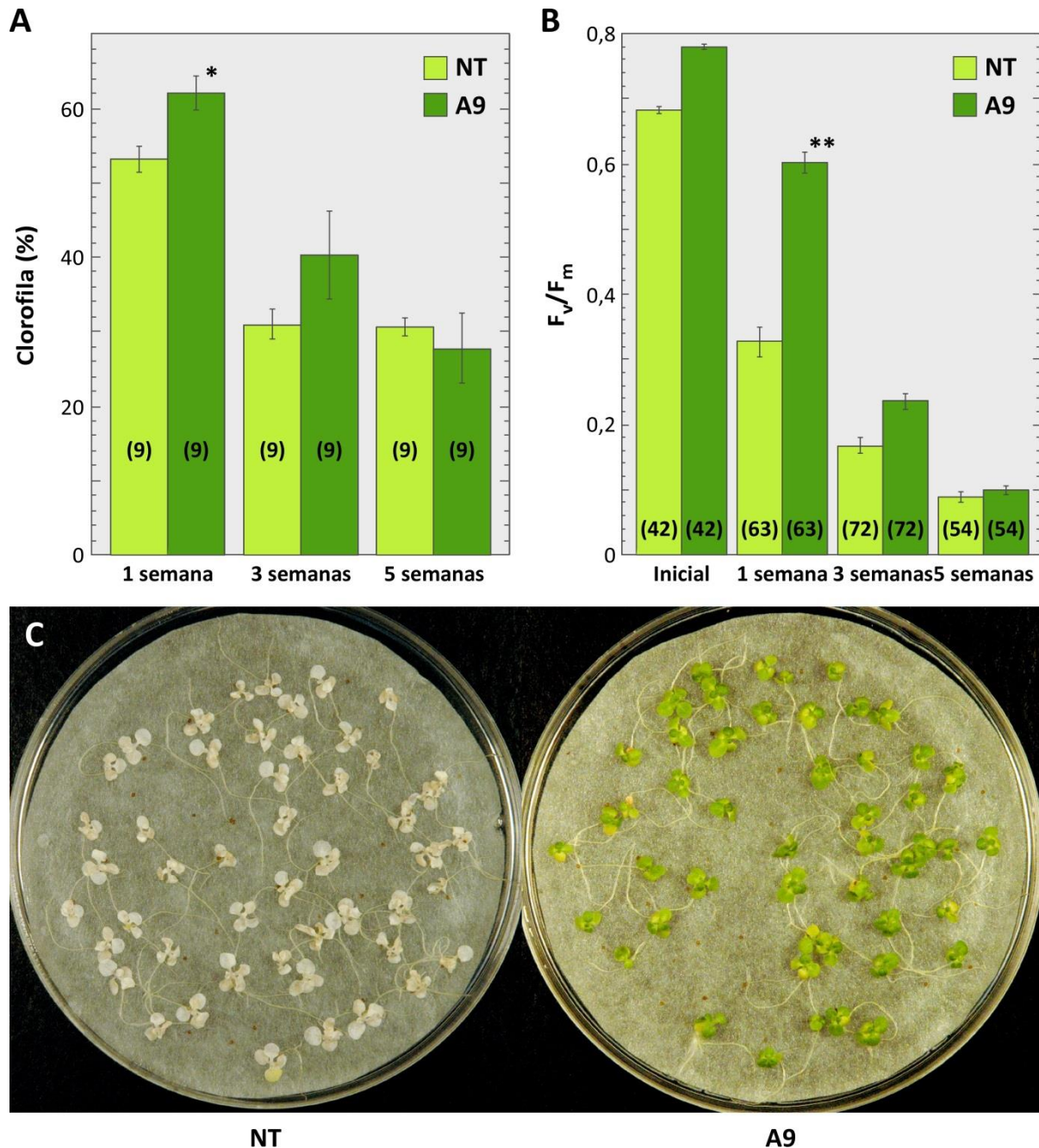
las plántulas 35S:A9, las cuales sobreexpresan ectópicamente el programa genético activado por *HaHSFA9*.



**Figura r10.** La aclimatación al calor no protege a las plántulas no transgénicas frente al daño oxidativo producido por tratamientos con alta concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Comparación del efecto de tratamientos con 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), entre las plántulas de 3-4 semanas 35S:A9 (A9) y sus hermanas no transgénicas (NT), bajo condiciones normales de cultivo (C) o tras un tratamiento previo de aclimatación al calor durante 3 h a 40 °C (AC). **(A)** Rendimiento cuántico máximo del PSII (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>), inmediatamente tras el tratamiento. Datos correspondientes a 2 experimentos independientes y 2-3 repeticiones por experimento, con 3 líneas homocigóticas independientes 35S:A9 (A9<sub>1</sub>, A9<sub>2</sub> y A9<sub>3</sub>) y sus correspondientes líneas hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub>, NT<sub>2</sub> y NT<sub>3</sub>). Entre paréntesis se indica el número de medidas correspondiente a cada valor promedio. **(B)** Fotografía representativa de la falta de supervivencia de las plántulas NT tras tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con aclimatación al calor previa. **(C)** Fotografía representativa de la falta de supervivencia de las plántulas 35S:A9 tras tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, sin aclimatación al calor previa. **(D)** Fotografía representativa de la supervivencia de las plántulas 35S:A9 tras tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con aclimatación al calor previa. Las fotografías se tomaron después de 7 días de recuperación tras los tratamientos.

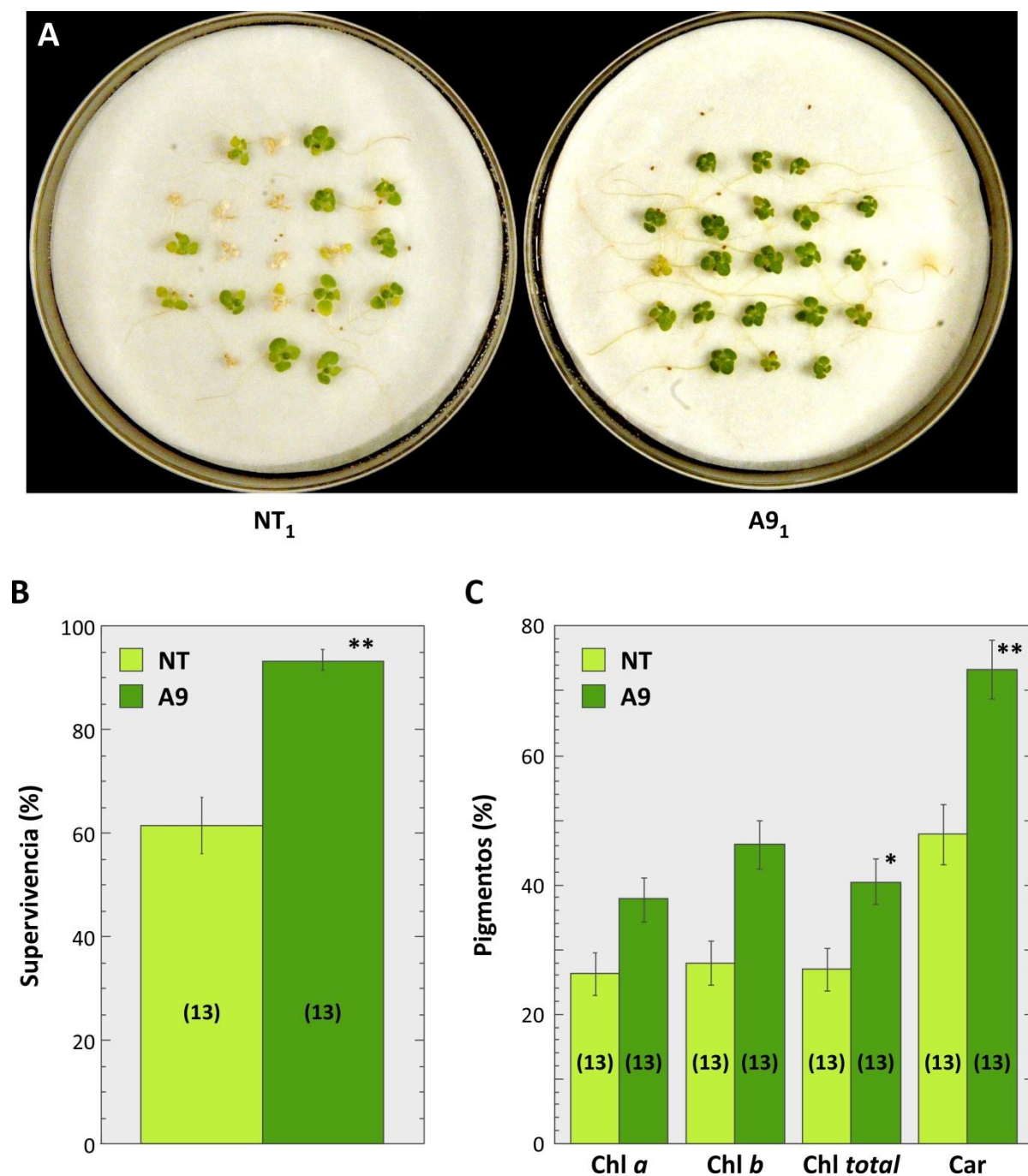
## 8. La sobreexpresión ectópica del factor *HaHSFA9* retarda la senescencia vegetativa en las plántulas 35S:A9.

El proceso de senescencia de la hoja está asociado con el estrés oxidativo y la sobreproducción de ROS (Khanna-Chopra *et al.*, 2013). La protección frente a estrés oxidativo, tanto del PSII como del PSI, observada en las plántulas 35S:A9 podría, por tanto, retrasar el proceso de senescencia en estas plántulas. El proceso de senescencia natural de la planta puede acelerarse mediante el cultivo bajo condiciones de oscuridad continua y falta de nutrientes (ver por ejemplo Carrión *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2008). Para inducir la senescencia, las plántulas de se incubaron sobre papeles humedecidos con H<sub>2</sub>O desionizada y oscuridad continua, durante un periodo máximo de 5 semanas. La pérdida de clorofila es la característica más prominente del síndrome de senescencia en hojas y otros tejidos fotosintéticos (Noodén, 1988). Para analizar el desarrollo del proceso de senescencia, cuantificamos la pérdida de pigmentos fotosintéticos y el rendimiento cuántico máximo del PSII después de 1, 3 y 5 semanas de tratamiento en oscuridad (**Figura r11**). Tras una semana de tratamiento, las plántulas NT redujeron prácticamente a la mitad la cantidad de clorofila ( $53,24 \pm 1,78$  %), mientras las plántulas 35S:A9 conservaron el  $61,91 \pm 2,29$  %. Esta diferencia es estadísticamente significativa ( $t=-2,99$ ;  $P=0,009$ ). Sin embargo, a partir de la primera semana de tratamiento, esta diferencia se redujo, hasta llegar a igualarse tras 5 semanas de tratamiento en la oscuridad. Así, tras 3 semanas de tratamiento en la oscuridad, las plántulas NT sólo mantuvieron el  $30,95 \pm 2,08$  % de la clorofila inicial, mientras que las plántulas 35S:A9 mantuvieron el  $40,19 \pm 5,95$  %. Esta diferencia entre las plántulas 35S:A9 y NT se anuló a las 5 semanas de tratamiento en la oscuridad (**Figura r11A**). De igual modo, tras 1 semana en oscuridad, las plántulas 35S:A9 mostraron mayor valor de  $F_v/F_m$  que las plántulas NT ( $F_v/F_m = 0,601 \pm 0,017$  y  $0,326 \pm 0,022$ , respectivamente). Esta diferencia es estadísticamente significativa ( $t=-7,54$ ;  $P=0,0001$ ). Comparando estos valores con los obtenidos antes del tratamiento, observamos que tras una semana en la oscuridad el valor de  $F_v/F_m$  se redujo al 77,27 % en las plántulas 35S:A9, mientras que en las plántulas NT se redujo al 47,91 % del valor de  $F_v/F_m$  inicial. A las 3 semanas de tratamiento, la diferencia de  $F_v/F_m$  entre las plántulas 35S:A9 y NT se redujo, observándose una reducción al 30,26 % y 24,60 % del valor inicial, respectivamente ( $F_v/F_m = 0,235 \pm 0,012$  y  $0,168 \pm 0,013$ , en las plántulas 35S:A9 y NT, respectivamente). Esta diferencia se anuló completamente tras 5 semanas de tratamiento en la oscuridad (**Figura r11B**). Además, después de 7 días de recuperación tras 3 semanas de tratamiento en la oscuridad, sólo las plántulas 35S:A9 sobrevivieron, mientras que las plántulas



**Figura r11. Retardo de la senescencia vegetativa inducida por la oscuridad continua en las plántulas 35S:A9.** Comparación de la aparición de la senescencia entre las plántulas de 3-4 semanas 35S:A9 (A9) y sus hermanas no transgénicas (NT), tras tratamientos de inducción de la senescencia por falta de nutrientes en la oscuridad. **(A)** Reducción de pigmentos fotosintéticos en las plántulas durante el tratamiento de senescencia en la oscuridad. Valores correspondientes al porcentaje de pigmentos medidos tras 1, 3 o 5 semanas de tratamiento, en relación a la cantidad de pigmento inicial. **(B)** Rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ). Valores tomados antes del tratamiento, o tras 1, 3 o 5 semanas de tratamiento en la oscuridad. **(C)** Fotografía representativa tomada a los 7 días de recuperación tras 3 semanas de tratamiento en la oscuridad. Datos correspondientes a 5 experimentos independientes y 1-2 repeticiones por experimento, con 3 líneas homocigóticas independientes 35S:A9 (A9<sub>1</sub>, A9<sub>2</sub> y A9<sub>3</sub>) y sus correspondientes líneas hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub>, NT<sub>2</sub> y NT<sub>3</sub>). Entre paréntesis se indica el número de medidas correspondiente a cada valor promedio. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas:  $P=0,01$  (\*) y  $P=0,0001$  (\*\*).





**Figura r12. Retardo de la senescencia vegetativa inducida por falta de nutrientes en las plántulas 35S:A9 bajo condiciones de cultivo con fotoperiodo.** Comparación de la aparición de la senescencia entre las plántulas de 3-4 semanas 35S:A9 (A9) y sus correspondientes hermanas no transgénicas (NT), tras tratamientos de inducción de la senescencia por falta de nutrientes bajo fotoperiodo. **(A)** Fotografía representativa tomada inmediatamente tras el tratamiento de inducción de la senescencia. **(B)** Porcentaje de supervivencia de las plántulas tras el tratamiento. **(C)** Porcentaje de pigmentos fotosintéticos en las plántulas tras el tratamiento de inducción de la senescencia. Datos correspondientes a 2 experimentos independientes y 2-3 repeticiones por experimento, con 3 líneas homocigóticas independientes 35S:A9 (A9<sub>1</sub>, A9<sub>2</sub> y A9<sub>3</sub>) y sus correspondientes líneas hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub>, NT<sub>2</sub> y NT<sub>3</sub>). Porcentajes calculados en relación a los valores iniciales de pigmentos. Entre paréntesis se indica el número de medidas correspondiente a cada valor promedio. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas:  $P=0,01$  (\*) y  $P=0,0001$  (\*\*).

NT se despigmentaron y murieron en su totalidad (**Figura r11C**). Estos resultados indican un retardo en el proceso de senescencia vegetativa en las plántulas 35S:A9. Para comprobar este retardo en la senescencia, realizamos ensayos de inducción de senescencia por falta de nutrientes bajo fotoperiodo (ver por ejemplo, Thomas & de Villiers, 1996). Las plántulas 35S:A9 y NT, se transfirieron sobre papel humedecido con H<sub>2</sub>O desionizada, y se cultivaron durante 6 días a una intensidad lumínica de 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en ciclo de luz 16h día/8h noche (**Figura r12**). Durante el tratamiento, observamos la despigmentación progresiva de las plántulas. Al final del tratamiento, el 93,41  $\pm$  2,06 % de las plántulas 35S:A9 sobrevivieron, frente al 61,54  $\pm$  5,51 % de supervivencia observado en las plántulas NT (**Figura r12A y B**). Esta diferencia es estadísticamente significativa ( $F=29,36$ ;  $P=0,0001$ ). Además, las plántulas 35S:A9 conservaron mejor los pigmentos fotosintéticos que las plántulas NT, tras el tratamiento (**Figura r12C**). Así, las plántulas 35S:A9 mantuvieron el 40,38  $\pm$  3,74 % de la clorofila inicial, mientras que las plántulas NT mantuvieron el 26,83  $\pm$  3,36 %. Esta diferencia es estadísticamente significativa ( $F=7,71$ ;  $P=0,0105$ ), y se debe al aumento en la conservación tanto de la clorofila *a*, como de clorofila *b*. Las plántulas 35S:A9 también conservaron mayor cantidad de carotenos tras el tratamiento de inducción de senescencia por falta de nutrientes. Las plántulas 35S:A9, conservaron el 73,29  $\pm$  4,53 % de los carotenoides iniciales, mientras que las plántulas NT sólo conservaron el 47,87  $\pm$  4,65 %. Esta diferencia es estadísticamente significativa ( $F=15,33$ ;  $P=0,00065$ ). Estos resultados indican que el programa genético activado por el factor *HaHSFA9* en plántulas de tabaco retarda el proceso de senescencia de la hoja.

### B. Estudio de la interacción funcional entre los factores *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* en plantas transgénicas de tabaco.

Los trabajos previos de nuestro laboratorio indican que el programa genético activado por HSFA9 requiere de otros factores HSF adicionales para su activación (Tejedor-Cano *et al.*, 2010; Carranco *et al.*, 2010). Aunque el número de HSF adicionales se desconoce actualmente, la disminución de la longevidad de semillas observada al sobreexpresar una forma represora activa de HSFA9, y no observada al sobreexpresar formas inactivas del mismo HSF, sugiere que el programa implicado en la longevidad de semillas requiere de otros factores HSF de clase A adicionales (Tejedor-Cano *et al.*, 2010). En trabajos recientes de nuestro laboratorio (Tejedor *et al.*, 2014) se clonó y caracterizó el factor *HaHSFA4a*, un HSF que interacciona con el factor *HaHSFA9* en embriones de girasol. El factor *HaHSFA4a* muestra interacción nuclear con *HaHSFA9*, *in planta*. Además, *HaHSFA4a* junto con *HaHSFA9* pueden co-activar sinérgicamente la transcripción a partir de promotores de genes *hsp* dianas de *HaHSFA9* (Tejedor *et al.*, 2014). Estos resultados indicaron a que el factor *HaHSFA4a* podría ser uno de los HSF de clase A adicionales que cooperan junto a *HaHSFA9*. Esto nos llevó a estudiar la posible mejora de los fenotipos previamente descritos para la sobreexpresión del factor *HaHSFA9* en plántulas de tabaco, sobreexpresando conjuntamente *HaHSFA9* y *HaHSFA4a*.

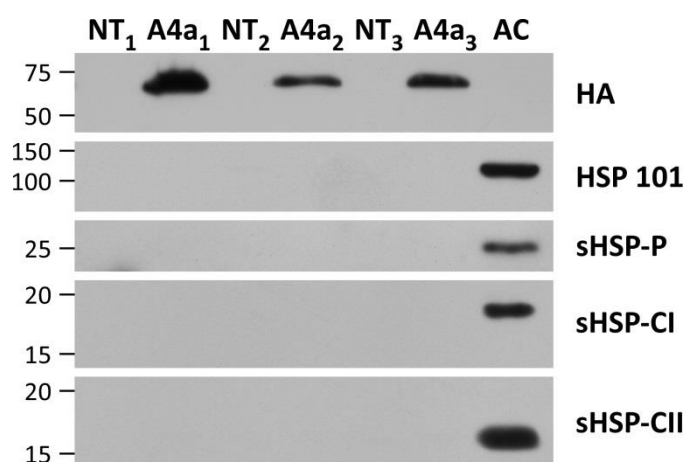
#### 1. La sobreexpresión ectópica del factor *HaHSFA4a* en plántulas de tabaco no confiere ninguno de los fenotipos descritos para la sobreexpresión ectópica de *HaHSFA9*.

En primer lugar, comparamos los efectos de la sobreexpresión ectópica del factor *HaHSFA4a* en plántulas de tabaco, con los fenotipos previamente descritos para la sobreexpresión ectópica de *HaHSFA9* en las plántulas 35S:A9. Para ello, obtuvimos plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi) que sobreexpresaban en homocigosis el factor *HaHSFA4a* bajo el promotor constitutivo CaMV 35S (líneas 35S:A4a). Obtuvimos transformantes independientes con una única integración del transgén *35S:HaHSFA4a*. Se seleccionaron las 3 líneas que mejor expresaban el transgén *35S:HaHSFA4a* en homocigosis, en función de la acumulación del *tag* HA (Hemaglutinina) fusionado a *HaHSFA4a*, detectado por *western blot* tras electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE (líneas A4a<sub>1</sub>, A4a<sub>2</sub> y A4a<sub>3</sub>). Sus correspondientes líneas hermanas no

transgénicas se obtuvieron por segregación (líneas NT<sub>1</sub>, NT<sub>2</sub> y NT<sub>3</sub>, respectivamente). Las plántulas de 3-4 semanas de estas líneas, se usaron para analizar el posible efecto del factor *HaHSFA4a* sobre la acumulación de las proteínas HSP inducidas en el programa genético activado por *HaHSFA9*, así como la posible aparición de fenotipos como los descritos previamente para las plántulas 35S:A9. Para ello, seguimos los procedimientos descritos previamente para el análisis de dichas líneas 35S:A9.

### 1.1. La sobreexpresión ectópica del factor *HaHSFA4a* no induce la acumulación de proteínas HSP en las plántulas 35S:A4a a temperaturas normales de crecimiento.

La sobreexpresión del factor *HaHSFA9*, tanto en semillas DS10:A9 como en plántulas 35S:A9, indujo la acumulación específica de proteínas HSP a temperaturas normales de crecimiento: HSP101, sHSP-CI, sHSP-CII (Prieto-Dapena *et al.*, 2006, 2008) y sHSP-P (ver **Figura r2**). Esto nos llevó a estudiar si la sobreexpresión del factor *HaHSFA4a* también induce la acumulación de dichas proteínas HSP en las mismas condiciones. Para ello, caracterizamos por *western blot* tras electroforesis desnaturizante SDS-PAGE la acumulación de proteínas HSP en las plántulas 35S:A4a, usando anticuerpos específicos frente a las proteínas HSP101, sHSP-CI, sHSP-CII y sHSP-P (**Figura r13**). Comparamos la acumulación de estas proteínas HSP en las plántulas 35S:A4a (A4a) con sus correspondientes hermanas no transgénicas (NT) en condiciones normales de cultivo, así como con las plántulas NT aclimatadas al calor tras un tratamiento de 3 h a 40 °C (AC). La detección con el anticuerpo frente al *tag* HA mostró la expresión del transgén *35S:HaHSFA4a* en las plántulas 35S:A4a. Sin embargo, no se detectó acumulación de ninguna de las proteínas HSP analizadas (HSP101, sHSP-CI, sHSP-CII y sHSP-P), tanto en las líneas NT como en las 35S:A4a. No obstante, la acumulación de estas proteínas sí se indujo tras la aclimatación al calor de las plántulas. Estos resultados nos muestran que la sobreexpresión del factor *HaHSFA4a* en plántulas de tabaco, no induce la acumulación de las proteínas HSP analizadas a temperaturas normales de crecimiento.

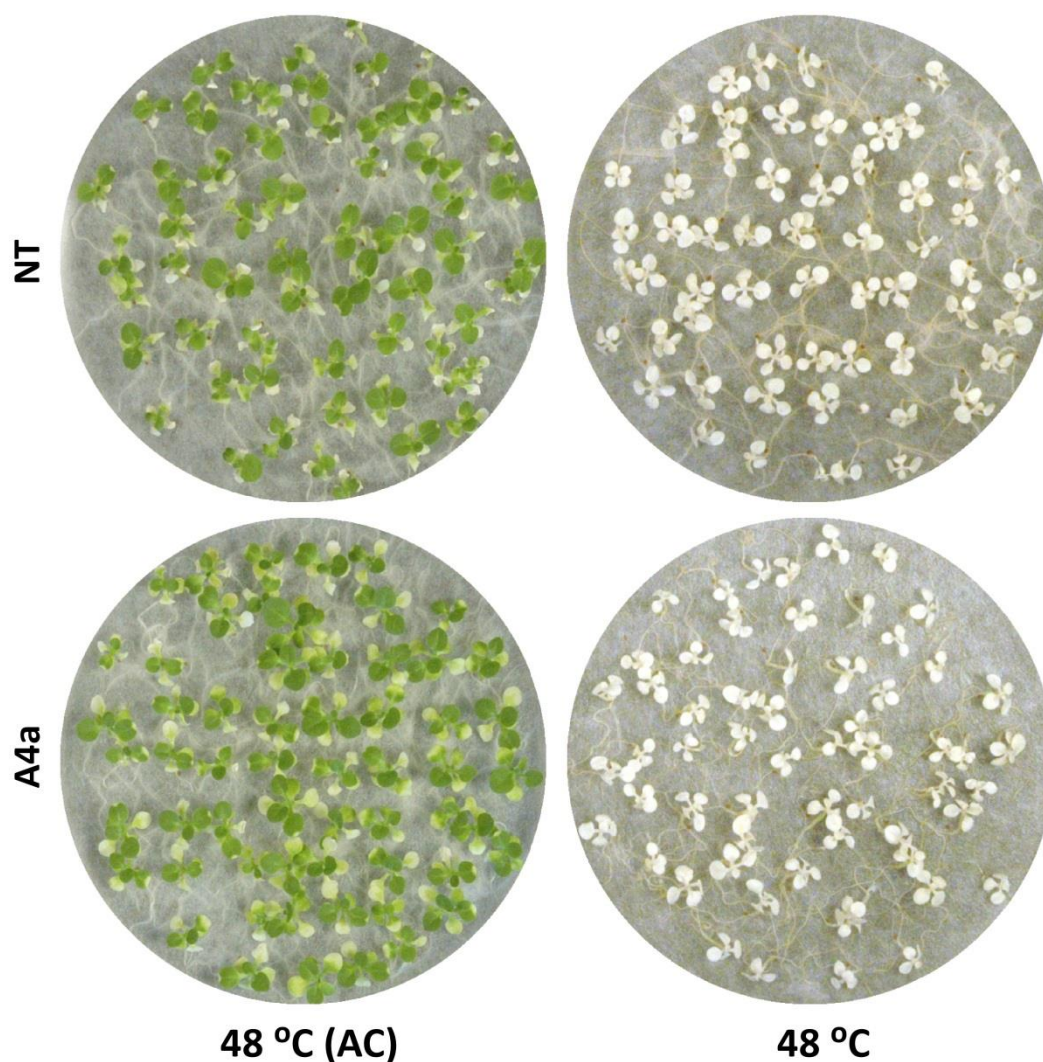


**Figura r13.** La sobreexpresión ectópica de *HaHSFA4a* no induce la acumulación de proteínas HSP en las plántulas 35S:A4a bajo condiciones normales de cultivo. Detección de la acumulación de proteínas HSP, mediante *western blot* tras electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE, en plántulas transgénicas de tabaco 35S:A4a, y sus hermanas no transgénicas (NT). Se usaron anticuerpos específicos contra las proteínas: HA, *tag* de hemaglutinina unido a *HaHSFA4a*; HSP-101; sHSP-P; sHSP-CI y sHSP-CII. Se analizaron muestras de plántulas de 3-4 semanas correspondientes a 3 líneas homocigóticas independientes 35S:A4a (A4a<sub>1</sub>, A4a<sub>2</sub> y A4a<sub>3</sub>) y sus correspondientes líneas hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub>, NT<sub>2</sub> y NT<sub>3</sub>), cultivadas a temperaturas normales de crecimiento, así como una línea NT sometida a un tratamiento de aclimatación al calor durante 3 h a 40 °C (AC). A la izquierda, se indican los marcadores de peso molecular (kDa). A la derecha se indica el anticuerpo específico usado para la detección de cada proteína.

### 1.2. La sobreexpresión ectópica del factor *HaHSFA4a* no confiere termotolerancia en las plántulas 35S:A4a.

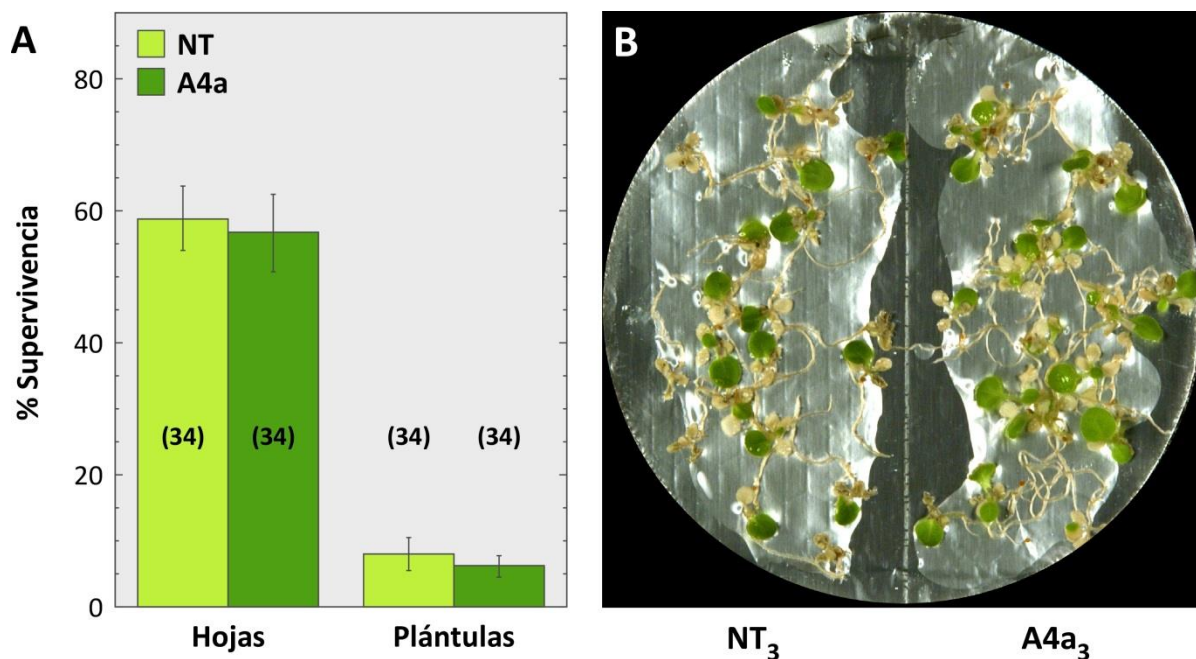
A continuación, estudiamos si la sobreexpresión ectópica de *HaHSFA4a* en plántulas de tabaco confiere termotolerancia, tal como se observó al sobreexpresar ectópicamente *HaHSFA9* (Prieto-Dapena *et al.*, 2008). Las plántulas 35S:A4a y NT se sometieron a un choque térmico a 48 °C durante 2,5 horas para analizar su termotolerancia basal. Adicionalmente se ensayó la termotolerancia adquirida, comparando la supervivencia de estas plántulas, con la obtenida al someter a las plántulas al mismo choque térmico, tras un tratamiento previo de aclimatación al calor durante 3 horas a 40 °C (Figura r14). Las plántulas 35S:A4a, al igual que las plántulas NT, no sobrevivieron a los tratamientos de choque térmico a 48 °C, a menos que se las acondicionase previamente con un tratamiento de aclimatación al calor. Estos resultados muestran que la sobreexpresión ectópica de *HaHSFA4a* no confiere termotolerancia, ni basal ni adquirida, a las plántulas de tabaco 35S:A4a.





**Figura r14.** La sobreexpresión ectópica de *HaHSFA4a* no confiere termotolerancia a las plántulas **35S:A4a**. Comparación de la termotolerancia basal y adquirida entre plántulas de 3-4 semanas 35S:A4a (A4a) y sus correspondientes hermanas no transgénicas (NT). Se estudió la supervivencia de las plántulas tras tratamientos de choque térmico durante 2,5 h a 48 °C (48 °C), con o sin un tratamiento previo de aclimatación al calor durante 3 h a 40 °C (AC). Se realizaron 4 experimentos independientes y 2-3 repeticiones por experimento, con 3 líneas homocigóticas independientes 35S:A4a (A4a<sub>1</sub>, A4a<sub>2</sub> y A4a<sub>3</sub>) y sus correspondientes líneas hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub>, NT<sub>2</sub> y NT<sub>3</sub>). Se muestran fotografías representativas correspondientes a una línea 35S:A4a y su correspondiente línea hermana NT. Las fotografías se tomaron después de una semana de recuperación tras el tratamiento de choque térmico.

### 1.3. La sobreexpresión ectópica del factor *HaHSFA4a* no confiere tolerancia a condiciones extremas de deshidratación ni de estrés oxidativo en las plántulas 35S:A4a.



**Figura r15.** La sobreexpresión ectópica de *HaHSFA4a* no confiere tolerancia frente a deshidratación severa a las plántulas 35S:A4a. Comparación de la supervivencia tras tratamientos de deshidratación severa DT2 entre plántulas de 3-4 semanas 35S:A4a (A4a) y sus hermanas no transgénicas (NT). **(A)** Porcentaje de supervivencia de plántulas completas (Plántulas) o de plántulas con al menos una hoja viva (Hojas). Datos correspondientes a 4 experimentos independientes y 2-3 repeticiones por experimento, con 3 líneas homocigóticas independientes 35S:A4a (A4a<sub>1</sub>, A4a<sub>2</sub> y A4a<sub>3</sub>) y sus correspondientes líneas hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub>, NT<sub>2</sub> y NT<sub>3</sub>). Resultados cuantificados después de 7 días de recuperación tras el tratamiento de deshidratación. Entre paréntesis se indica el número de medidas correspondiente a cada valor promedio. **(B)** Fotografía representativa de la supervivencia tras el tratamiento DT2, correspondiente a una línea 35S:A4a (A4a<sub>3</sub>) y su línea hermana no transgénica (NT<sub>3</sub>). Las fotografías se tomaron después de 7 días de recuperación tras el tratamiento de deshidratación severa.

Finalmente, estudiamos si la sobreexpresión ectópica de *HaHSFA4a* en plántulas de tabaco confiere tolerancia a condiciones extremas de deshidratación y de estrés oxidativo. Las plántulas 35S:A4a, así como sus correspondientes hermanas NT, fueron sometidas a tratamientos de deshidratación severa DT2, en los cuales obtuvimos pérdidas de aproximadamente el 95% del contenido inicial de agua en la plántula (correspondientes a potenciales hídricos  $\phi = -15\text{MPa}$ ). Inmediatamente tras el tratamiento, las plántulas se rehidrataron y se dejaron recuperar durante un periodo de 7 días. Posteriormente, cuantificamos la supervivencia de las plántulas tras los tratamientos de deshidratación severa (**Figura r15**). No se observaron diferencias entre

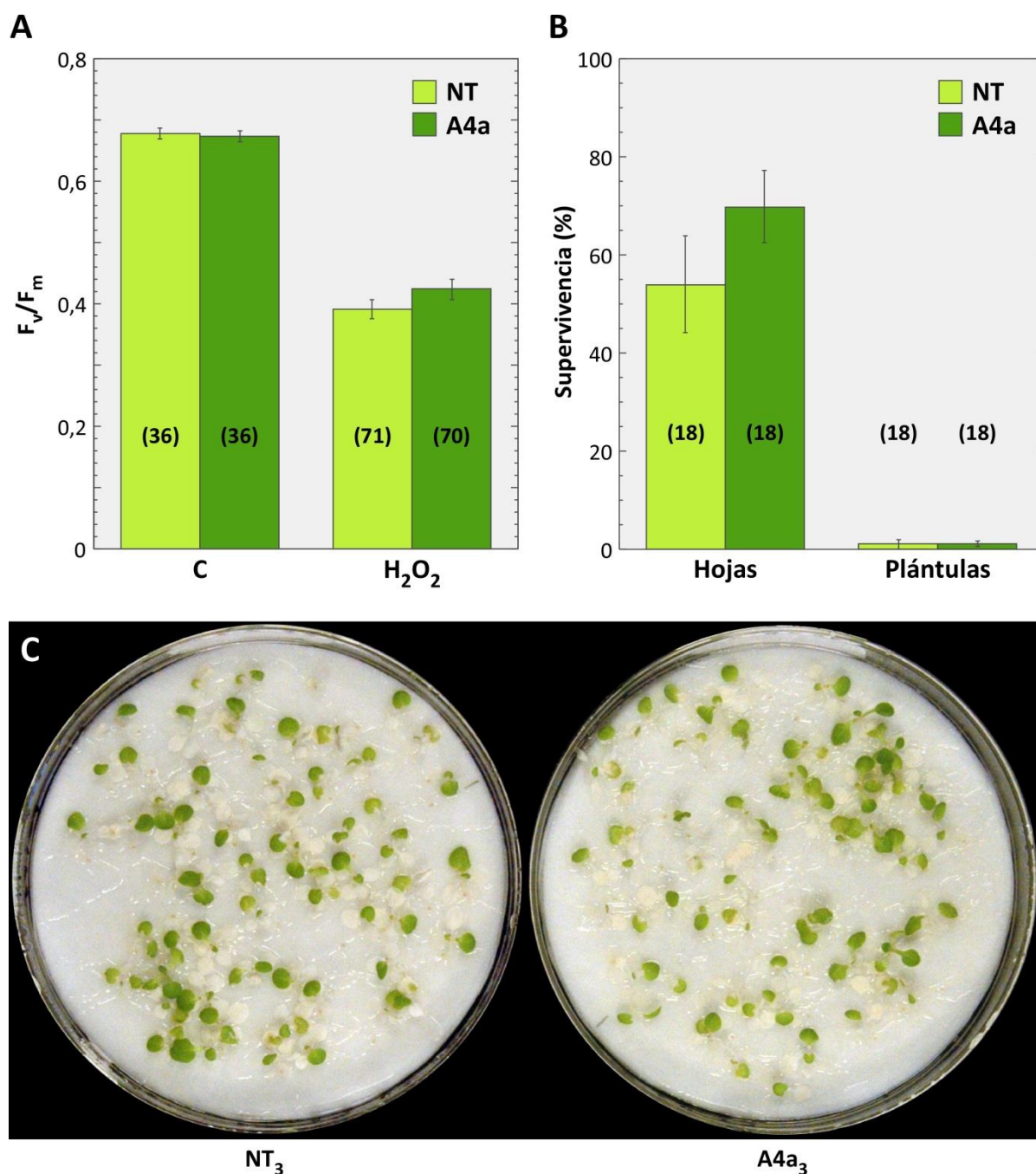
la supervivencia de las plántulas 35S:A4a y sus hermanas NT. Aunque aproximadamente el 60 % de las plántulas mantuvieron al menos una hoja viva ( $56,67 \pm 5,83$  % en las líneas 35S:A4a y  $58,77 \pm 4,88$  % en las líneas NT), la mayor parte de las plántulas murieron, tanto en las líneas 35S:A4a como en sus líneas hermanas NT, observándose una supervivencia similar entre ambas:  $6,12 \pm 1,71$  % y  $7,99 \pm 2,50$  %, respectivamente, sin diferencia estadísticamente significativa ( $t=0,5416$ ;  $P=0,6146$ ).

Para estudiar la tolerancia a condiciones extremas de estrés oxidativo, sometimos a las plántulas 35S:A4a y sus hermanas NT a tratamientos con 200 mM  $H_2O_2$  durante 24 h en la oscuridad, tal como los descritos previamente para el estudio de las plántulas 35S:A9. Tras el tratamiento, se eliminó completamente el  $H_2O_2$ , y se dejaron recuperar las plántulas durante un periodo de 7 días (**Figura r16**). Inmediatamente tras el tratamiento con 200 mM  $H_2O_2$ , se analizó la integridad del PSII mediante el valor de  $F_v/F_m$  (**Figura r16A**). El valor  $F_v/F_m$  disminuyó por igual en las líneas 35S:A4a y NT ( $F_v/F_m=0,337 \pm 0,017$  y  $0,336 \pm 0,011$ , respectivamente), no observándose diferencias significativas ( $F=0,535$ ;  $P=0,4654$ ). Posteriormente, analizamos la supervivencia de las plántulas tras los tratamientos con 200 mM  $H_2O_2$  (**Figura r16B y C**). Después de 7 días de recuperación, observamos que más del 50 % de las plántulas conservaron al menos una hoja viva, tanto en las líneas 35S:A4a como en sus líneas hermanas NT ( $69,84 \pm 7,32$  % en las líneas 35S:A4a y  $54,05 \pm 9,77$  % en las líneas NT). Sin embargo, prácticamente la totalidad de las plántulas 35S:A4a y NT murieron, observándose una supervivencia similar en las plántulas 35S:A4a y sus hermanas NT:  $1,11 \pm 1,01$  % y  $1,27 \pm 0,56$  %, respectivamente, sin diferencia estadísticamente significativa ( $t=-0,1394$ ;  $P=0,8902$ ). Estos resultados demuestran que la sobreexpresión ectópica de *HaHSFA4a* en plántulas de tabaco no confiere tolerancia a condiciones extremas de deshidratación o de estrés oxidativo.

## 2. La sobreexpresión ectópica conjunta de los factores *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* en plántulas de tabaco mejora los fenotipos previamente descritos para la sobreexpresión de *HaHSFA9*.

Una vez estudiados los efectos fenotípicos de la sobreexpresión ectópica del factor *HaHSFA4a* en plántulas de tabaco, estudiamos los efectos de la sobreexpresión ectópica conjunta de *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* en plántulas de tabaco. A partir de las líneas 35S:A9 (Prieto-Dapena *et al.*, 2008), obtuvimos plantas dobles transgénicas de tabaco que sobreexpresan en





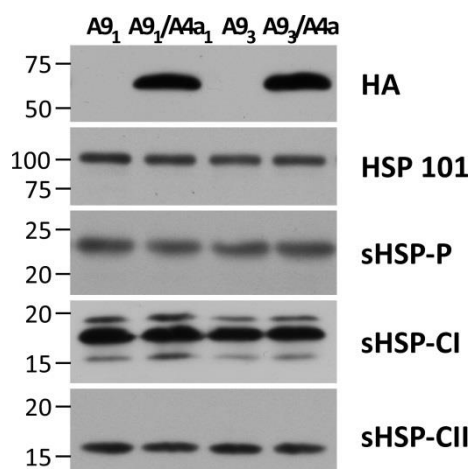
**Figura r16.** La sobreexpresión ectópica de *HaHSFA4a* no confiere tolerancia frente a estrés oxidativo severo a las plántulas 35S:A4a. Comparación entre las plántulas de 3-4 semanas 35S:A4a (A4a) y sus correspondientes hermanas no transgénicas (NT), tras un tratamiento con 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) o H<sub>2</sub>O (C), durante 24 h en oscuridad. (A) Efectos sobre el rendimiento cuántico máximo del PSII (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>), inmediatamente tras el tratamiento. (B) Porcentaje de supervivencia de plántulas completas (Plántulas) o de plántulas con al menos una hoja viva (Hojas). Resultados cuantificados después de 7 días de recuperación tras el tratamiento con 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (C) Fotografía representativa de la supervivencia tras el tratamiento con 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, correspondiente a una línea 35S:A4 (A4a<sub>3</sub>) y su línea hermana no transgénica (NT<sub>3</sub>). Las fotografías se tomaron después de 7 días de recuperación tras el tratamiento. Datos correspondientes a 3 experimentos independientes y 2 repeticiones por experimento, con 3 líneas homocigóticas independientes 35S:A4a (A4a<sub>1</sub>, A4a<sub>2</sub> y A4a<sub>3</sub>) y sus correspondientes líneas hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub>, NT<sub>2</sub> y NT<sub>3</sub>). Entre paréntesis se indica el número de medidas correspondiente a cada valor promedio.

homocigosis el factor *HaHSFA4a* bajo el promotor constitutivo CaMV 35S, conjuntamente a la sobreexpresión ectópica de *HaHSFA9* (líneas 35S:A9/A4a). Obtuvimos transformantes independientes con una única integración del transgén 35S:*HaHSFA4a*. Se seleccionaron las 4 líneas dobles transgénicas que mejor expresaban el transgén 35S:*HaHSFA4a*, en función de la acumulación del *tag* HA, fusionado a *HaHSFA4a*, detectado por *western blot* en electroforesis desnaturizante SDS-PAGE. Las 4 líneas 35S:A9/A4a seleccionadas, presentaban diferentes eventos de integración simple del transgén 35S:*HaHSFA4a* en homocigosis, integrados en 3 fondos genéticos 35S:A9 diferentes (líneas A9<sub>1</sub>/A4a<sub>1</sub>, A9<sub>1</sub>/A4a<sub>2</sub>, A9<sub>2</sub>/A4a y A9<sub>3</sub>/A4a). Sus correspondientes líneas hermanas transgénicas simples para *HaHSFA9* se obtuvieron por segregación (líneas A9<sub>1</sub>, A9<sub>2</sub> y A9<sub>3</sub>, respectivamente). Las plántulas de 3-4 semanas de estas líneas, se utilizaron para analizar los efectos de la sobreexpresión conjunta de *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* sobre la acumulación de las proteínas HSP codificadas por genes activados por *HaHSFA9*, así como la posible mejora de los fenotipos descritos previamente para las plántulas 35S:A9. Para ello, seguimos los procedimientos descritos previamente para el análisis de dichas líneas 35S:A9.

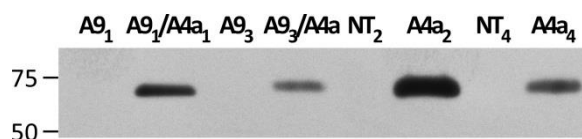
### 2.1. La sobreexpresión ectópica conjunta de *HaHSFA4a* y *HaHSFA9* aumenta la acumulación de determinadas isoformas HSP a temperaturas normales de crecimiento en las plántulas 35S:A9/A4a.

En primer lugar, caracterizamos el efecto sobre la acumulación de proteínas HSP, al sobreexpresar conjuntamente *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* en plántulas de tabaco. Para ello, comparamos por *western blot* en electroforesis desnaturizante SDS-PAGE la acumulación de HSP, entre las plántulas 35S:A9/A4a (A9/A4a) y 35S:A9 (A9), en condiciones normales de crecimiento, usando anticuerpos específicos frente al *tag* HA, y las proteínas HSP101, sHSP-CI, sHSP-CII y sHSP-P (**Figura r17**). No observamos diferencias de acumulación de ninguna de las proteínas HSP analizadas, entre las plántulas 35S:A9/A4a y 35S:A9. Sin embargo, la detección con el anticuerpo frente al *tag* HA mostró la expresión del transgén 35S:*HaHSFA4a* en las plántulas 35S:A9/A4a. Los niveles de acumulación del *tag* HA en las plántulas 35S:A9/A4a fueron del mismo orden de magnitud que los observados en las plántulas 35S:A4a, indicándonos que la expresión del transgén 35S:*HaHSFA4a* fue similar en las plántulas transgénicas 35S:A4a y en las plántulas dobles transgénicas 35S:A9/A4a (**Figura r18**). Estos resultados nos indican que la sobreexpresión ectópica conjunta de *HaHSFA4a* y *HaHSFA9* no induce cambios sustanciales en la

acumulación de proteínas HSP en las plántulas 35S:A9/A4a, en comparación con las plántulas 35S:A9.



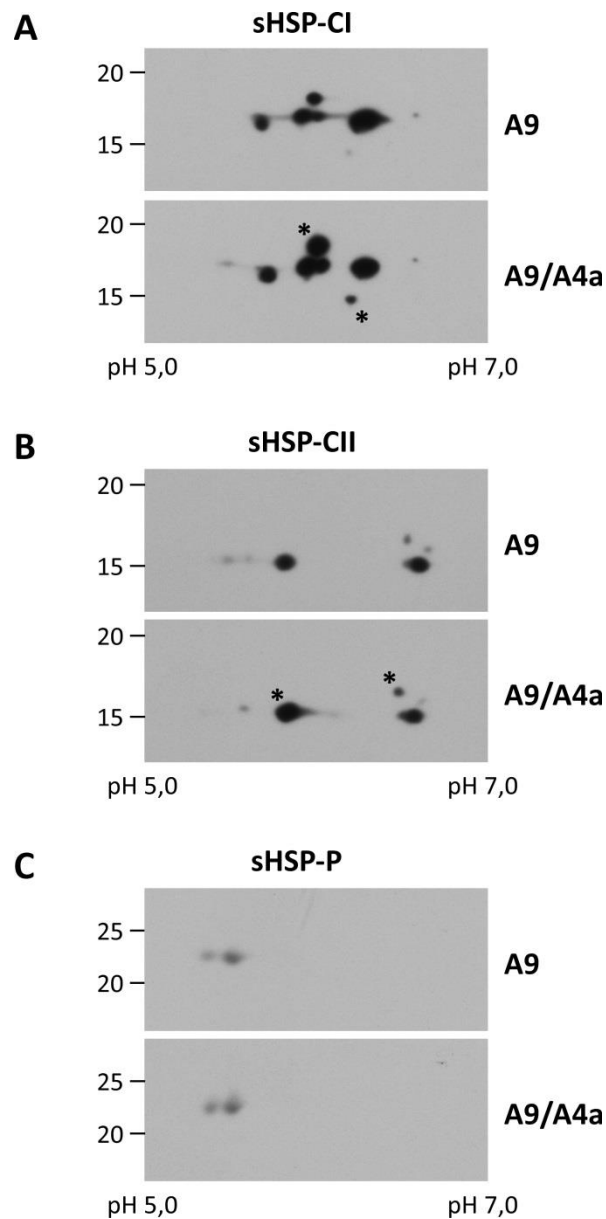
**Figura r17.** Efecto de la sobreexpresión ectópica conjunta de *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* sobre la acumulación de proteínas HSP bajo condiciones normales de crecimiento. Detección de la acumulación de proteínas HSP, mediante *western blot* tras electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE, en plántulas de 3-4 semanas dobles transgénicas 35S:A9/A4a y sus hermanas transgénicas simples 35S:A9. Se usaron anticuerpos específicos frente a las proteínas: HA, *tag* de hemaglutinina unido a *HaHSFA4a*; HSP-101; sHSP-P; sHSP-CI, y sHSP-CII. Se muestran resultados representativos de 2 líneas dobles transgénicas homocigóticas independientes 35S:A9/A4a ( $A9_1/A4a_1$  y  $A9_3/A4a$ ) y sus correspondientes hermanas transgénicas simples 35S:A9 ( $A9_1$  y  $A9_3$ ). A la izquierda, se indican los marcadores de peso molecular (KDa). A la derecha se indica el anticuerpo específico usado para la detección de cada proteína.



**Figura r18.** Acumulación del factor de transcripción *HaHSFA4a* en las plántulas transgénicas 35S:A4a y dobles transgénicas 35S:A9/A4a. Comparación mediante *western blot* tras electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE de la acumulación de la proteína *HaHSFA4a* en las plántulas de 3-4 semanas 35S:A4a y 35S:A9/A4a, detectada con el anticuerpo específico frente al *tag* HA (hemaglutinina) unido a *HaHSFA4a*. Se muestran resultados representativos correspondientes a 2 líneas dobles transgénicas homocigóticas independientes 35S:A9/A4a ( $A9_1/A4a_1$  y  $A9_3/A4a$ ) y sus líneas hermanas transgénicas simples 35S:A9 ( $A9_1$  y  $A9_3$ ), y 2 líneas transgénicas homocigóticas independientes 35S:A4a ( $A4a_2$  y  $A4a_4$ ) y sus hermanas no transgénicas ( $NT_2$  y  $NT_4$ ). A la izquierda, se indican los marcadores de peso molecular (KDa).

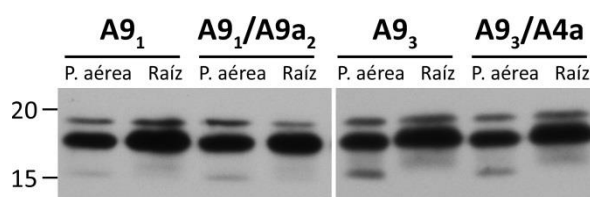
Aunque la acumulación de cada uno de los tipos de HSP analizados no se vio alterada en los *western blot* tras electroforesis desnaturizante SDS-PAGE mono-dimensional, realizamos un estudio más exhaustivo para las proteínas sHSP-CI, sHSP-CII y sHSP-P mediante *western blot* tras electroforesis bi-dimensional (2D-PAGE) (**Figura r19**). Así, pudimos observar pequeños aumentos en la acumulación de determinados polipéptidos de sHSP-CI y sHSP-CII en las plántulas 35S:A9/A4a, con respecto a las plántulas 35S:A9. Se observaron ligeros aumentos de acumulación del polipéptido sHSP-CI de mayor peso molecular aparente ( $\approx 19\text{KDa}$ ), así como del polipéptido de peso molecular más bajo ( $\approx 15\text{KDa}$ ) (**Figura r19A**, asteriscos). Además, observamos ligeros aumentos en la acumulación del polipéptido de pI más ácido perteneciente a las sHSP-CII, así como del polipéptido de peso molecular más alto correspondiente al grupo de polipéptidos de pI menos ácido (**Figura r19B**, asteriscos). Por el contrario, no se encontraron diferencias de acumulación en los polipéptidos correspondientes a sHSP-P, entre las líneas 35S:A9/A4a y 35S:A9 (**Figura r19C**). Estos resultados demuestran que la sobreexpresión ectópica conjunta de los factores *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* incrementa ligeramente la acumulación de algunas isoformas de las proteínas sHSP-CI y sHSP-CII, en comparación a lo observado para la sobreexpresión única del factor *HaHSFA9*.

El polipéptido sHSP-CI de peso molecular próximo a  $15\text{KDa}$ , acumulado a mayor nivel en las plántulas 35S:A9/A4a, está caracterizado como específico de semillas (Prieto-Dapena *et al.*, 2006). Además, este polipéptido no se acumuló en las raíces de las plántulas que sobreexpresan ectópicamente el factor *HaHSFA9* (ver **Figura r1**). Esto nos llevó a estudiar si la sobreexpresión ectópica conjunta de *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* en plántulas modificaba el patrón de acumulación de sHSP-CI en las raíces. De este modo, comparamos la acumulación de las proteínas sHSP-CI en la parte aérea y las raíces de las plántulas 35S:A9/A4a y sus hermanas 35S:A9, mediante *western blot* en electroforesis desnaturizante SDS-PAGE (**Figura r20**). No se observaron diferencias en el patrón de acumulación de sHSP-CI entre las raíces de las plántulas 35S:A9/A4a y 35S:A9. La banda correspondiente a las sHSP-CI de aproximadamente  $15\text{KDa}$  se detectó en las muestras correspondientes a la parte aérea, sin embargo, no se detectó acumulación de esta proteína en raíces, tanto en las plántulas 35S:A9 como en las plántulas 35S:A9/A4a. Estos resultados nos indican que la sobreexpresión conjunta de *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* en plántulas de tabaco no incrementa la acumulación en raíces del polipéptido sHSP-CI de peso molecular próximo a  $15\text{KDa}$  caracterizado como específico de semillas.



**Figura r19. Acumulación de polipéptidos sHSP en las plántulas 35S:A9/A4a.** Comparación de la acumulación de proteínas sHSP mediante *western blot* tras electroforesis 2D-PAGE entre plántulas de 3-4 semanas dobles transgénicas 35S:A9/A4a (A9/A4a), y sus correspondientes hermanas transgénicas simples 35S:A9 (A9). **(A)** Acumulación de sHSP-CI. **(B)** Acumulación de sHSP-CII. **(C)** Acumulación de sHSP-P. Se muestran resultados representativos obtenidos con, al menos, 2 líneas independientes 35S:A9/A4a y sus correspondientes líneas hermanas 35S:A9. Los asteriscos (\*) indican los polipéptidos inducidos diferencialmente entre las plántulas 35S:A9/A4a y 35S:A9. A la izquierda, se indican los marcadores de peso molecular (kDa). En la parte inferior, se indica el rango de pH (pH 5,0-7,0).

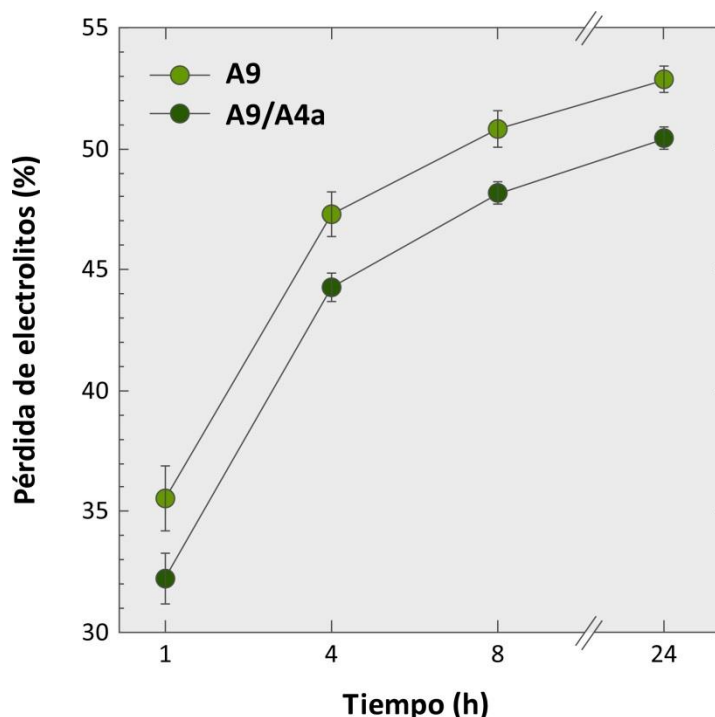




**Figura r20. Acumulación de sHSP-Cl en la parte aérea y las raíces de las plántulas 35S:A9/A4a.** Detección mediante *western blot* tras electroforesis desnaturalizante SDS-PAGE de la acumulación de proteínas de choque térmico sHSP-Cl en la parte aérea (P. aérea) y las raíces (Raíz) de las plántulas dobles transgénicas 35S:A9/A4a y sus hermanas transgénicas simples 35S:A9. Se muestran datos representativos correspondientes a dos líneas dobles transgénicas 35S:A9/A4a ( $A9_1/A4a_1$  y  $A9_3/A4a$ ) y sus líneas hermanas transgénicas simples 35S:A9 ( $A9_1$  y  $A9_3$ ). A la izquierda, se indican los marcadores de peso molecular (kDa).

## 2.2. La sobreexpresión ectópica conjunta de *HaHSFA4a* y *HaHSFA9* mejora la estabilidad de las membranas celulares en las plántulas 35S:A9/A4a.

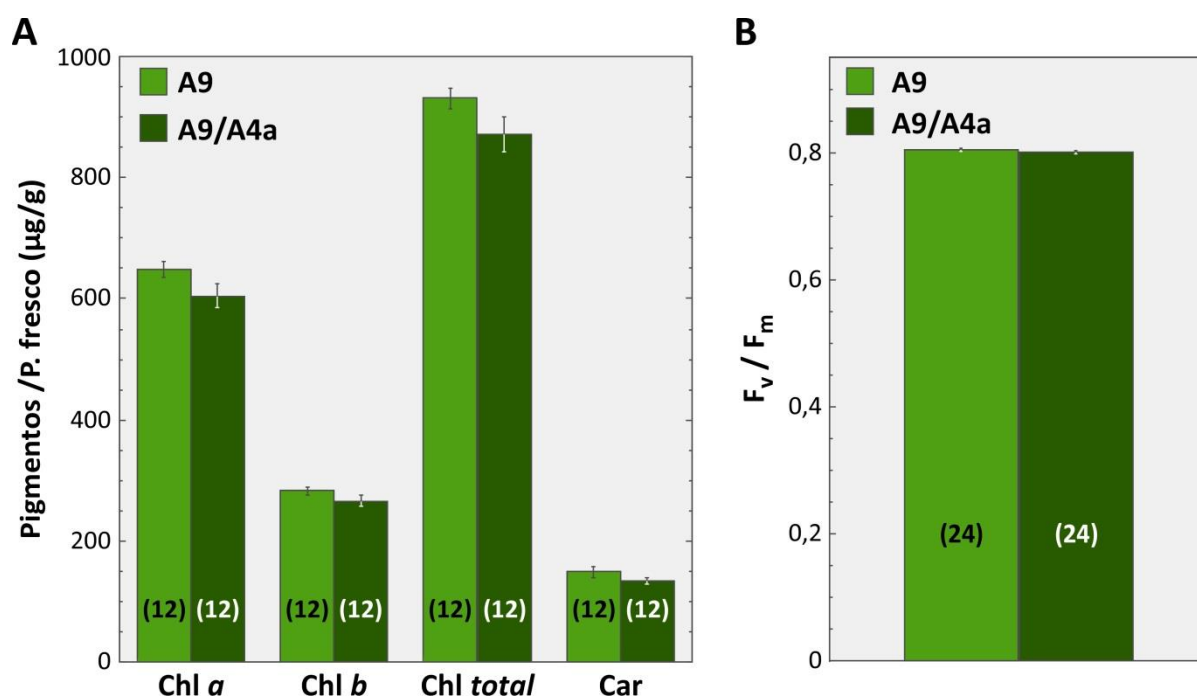
Las plántulas que sobreexpresan ectópicamente el factor *HaHSFA9* mostraron una mejora de la estabilidad de las membranas celulares (ver **Figura r5**). La sobreexpresión ectópica conjunta de *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* en las plántulas 35S:A9/A4a podría conllevar una mejora de la estabilidad de las membranas celulares, con respecto a la observada en las plántulas 35S:A9. Esto nos llevó a estudiar la pérdida de electrolitos en plántulas de 4 líneas 35S:A9/A4a y sus correspondientes líneas hermanas transgénicas simples 35S:A9 (**Figura r21**). Tras 1 h de tratamiento, las plántulas 35S:A9/A4a mostraron menor pérdida de electrolitos que las plántulas 35S:A9 ( $32,23 \pm 1,08 \%$  y  $35,56 \pm 1,33 \%$ , respectivamente). Esta diferencia se mantuvo constante durante todo el tratamiento. Así, al final del tratamiento, las plántulas 35S:A9/A4a mostraron una pérdida de electrolitos del  $50,42 \pm 0,47 \%$ , mientras que en las plántulas 35S:A9 la pérdida fue del  $52,85 \pm 0,56 \%$ . Esta diferencia en la pérdida de electrolitos es estadísticamente significativa ( $F=11,10$ ;  $P=0,002$ ) y muestra una mejora en la estabilidad de las membranas celulares en las plántulas 35S:A9/A4a, en comparación con la observada en las plántulas 35S:A9.



**Figura r21. Menor pérdida de electrolitos en las plántulas 35S:A9/A4a.** Comparación de la pérdida de electrolitos entre las plántulas de 3-4 semanas transgénicas dobles 35S:A9/A4a (A9/A4a) y sus hermanas transgénicas simples 35S:A9 (A9), en condiciones normales de crecimiento. Se representan los porcentajes promedio de pérdida de electrolitos en agua desionizada (MiliQ) a diferentes tiempos entre 1 y 24h: 1 h (n=17); 4 h (n=17); 8 h (n=17) y 24 h (n=17). Datos correspondientes a 2 experimentos independientes y 2-3 repeticiones por experimento, con 4 dobles transgénicas independientes 35S:A9/A4a (A9<sub>1</sub>/A4a<sub>1</sub>, A9<sub>1</sub>/A4a<sub>2</sub>, A9<sub>2</sub>/A4a y A9<sub>3</sub>/A4a) y sus correspondientes hermanas transgénicas simples 35S:A9 (A9<sub>1</sub>, A9<sub>2</sub>, A9<sub>3</sub>).

### 2.3. La sobreexpresión ectópica conjunta de *HaHSFA4a* y *HaHSFA9* en las plántulas 35S:A9/A4a no tiene efectos adicionales sobre la maquinaria fotosintética en condiciones normales de cultivo.

Las plántulas que sobreexpresan ectópicamente el factor *HaHSFA9* mostraron distintos efectos positivos sobre la maquinaria fotosintética bajo condiciones normales de cultivo (ver **Figura r6**). Esto nos llevó a estudiar el posible efecto de la sobreexpresión ectópica conjunta de *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* sobre la maquinaria fotosintética bajo dichas condiciones (**Figura r22**). En primer lugar, cuantificamos la acumulación de pigmentos fotosintéticos en las plántulas dobles transgénicas 35S:A9/A4a y sus hermanas transgénicas simples 35S:A9, bajo condiciones normales de crecimiento (**Figura r22A**). No se observaron diferencias en la acumulación de los pigmentos fotosintéticos entre las plántulas 35S:A9/A4a y sus hermanas 35S:A9. Así, las



**Figura r22.** La sobreexpresión conjunta de *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* en las plántulas 35S:A9/A4a no afecta adicionalmente a la maquinaria fotosintética en condiciones normales de cultivo. Comparación entre las plántulas de 3-4 semanas dobles transgénicas 35S:A9/A4a (A9/A4a) y sus hermanas transgénicas simples 35S:A9 (A9) bajo condiciones normales de cultivo. **(A)** Cuantificación del contenido en pigmentos fotosintéticos: clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*), clorofila total (Chl total) y carotenos (Car). Se representa el contenido en pigmentos fotosintéticos (µg) en relación al peso fresco (g). **(B)** Rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ). Datos correspondientes a 2-3 experimentos, con 4 líneas homocigóticas independientes 35S:A9/A4a (A9<sub>1</sub>/A4a<sub>1</sub>, A9<sub>1</sub>/A4a<sub>2</sub>, A9<sub>2</sub>/A4a y A9<sub>3</sub>/A4a) y sus líneas hermanas transgénicas simples 35S:A9 (A9<sub>1</sub>, A9<sub>2</sub>, A9<sub>3</sub>). Entre paréntesis se indica el número de medidas correspondiente a cada valor promedio.

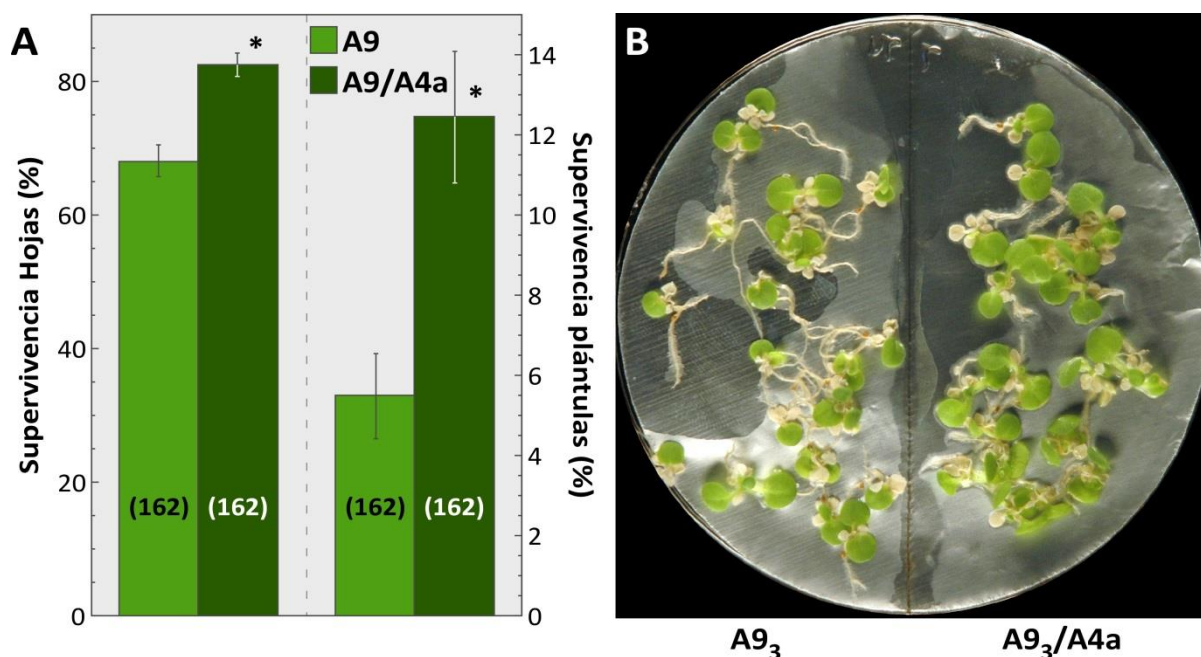
plántulas mostraron una acumulación similar de clorofila total ( $870,71 \pm 29,25$  y  $931,27 \pm 17,63$  µg Chl/g P. fresco en 35S:A9/A4a y 35S:A9, respectivamente;  $F=3,15$ ;  $P=0,08$ ). Tampoco se observaron diferencias en la acumulación de carotenos entre las plántulas 35S:A9/A4a y 35S:A9 ( $132,99 \pm 5,26$  y  $149,11 \pm 9,15$  µg car/g P. fresco en 35S:A9/A4a y 35S:A9, respectivamente;  $F=2,33$ ;  $P=0,14$ ). Además, analizamos la integridad del PSII de las plántulas 35S:A9/A4a y 35S:A9 mediante la medida de  $F_v/F_m$  en condiciones normales de crecimiento (**Figura r22B**). Tampoco se observaron diferencias en los valores de  $F_v/F_m$  entre las plántulas 35S:A9/A4a y 35S:A9 ( $F_v/F_m=0,801 \pm 0,004$  y  $0,808 \pm 0,003$ , respectivamente;  $F=2,01$ ;  $P=0,163$ ). Estos resultados nos indican que la sobreexpresión ectópica conjunta de *HaHSFA4a* y *HaHSFA9* en las plántulas 35S:A9/A4a no afecta a la maquinaria fotosintética bajo condiciones normales de cultivo, más allá de lo observado con la sobreexpresión individual de *HaHSFA9*.

### 2.4. La sobreexpresión ectópica conjunta de *HaHSFA4a* y *HaHSFA9* mejora la tolerancia frente a deshidratación severa en las plántulas 35S:A9/A4a.

La sobreexpresión ectópica de *HaHSFA9* en las plántulas 35S:A9 confirió tolerancia a tratamientos de deshidratación severa (Prieto-Dapena *et al.*, 2008). A continuación, estudiamos el efecto de la sobreexpresión ectópica conjunta de *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* en las plántulas 35S:A9/A4a sobre la tolerancia a deshidratación severa. Para poder estudiar esta posible mejora, tuvimos que forzar las condiciones de deshidratación hasta niveles en los que murieran la mayor parte de las plántulas 35S:A9. Para ello, sometimos a las plántulas dobles transgénicas 35S:A9/A4a, así como a sus hermanas transgénicas simples 35S:A9, a tratamientos de deshidratación severa DT2 (Prieto-Dapena *et al.*, 2008) en los que obtuvimos pérdidas superiores al 97 % del contenido inicial de agua de la plántula (correspondientes a potenciales hídricos inferiores a  $\phi \leq -30$  MPa). Inmediatamente tras los tratamientos, las plántulas se rehidrataron durante un periodo de recuperación de 7 días (**Figura r23**). Observamos que el  $82,53 \pm 1,84$  % de las plántulas 35S:A9/A4a conservaron al menos una hoja viva, en comparación con el  $68,15 \pm 2,34$  % observado en las plántulas 35S:A9. Este aumento de la supervivencia de la parte aérea en las plántulas 35S:A9/A4a con respecto a las 35S:A9 es estadísticamente significativo ( $t=-4,8245$ ;  $P=0,0001$ ). Además, el  $12,47 \pm 1,13$  % de las plántulas 35S:A9/A4a sobrevivieron a los tratamientos de deshidratación severa, frente al  $5,49 \pm 1,05$  % de supervivencia de las plántulas 35S:A9. Esta diferencia también es estadísticamente significativa ( $t=-3,5908$ ;  $P=0,00039$ ), y supuso un aumento de 2 veces la supervivencia de la plántula completa en las líneas 35S:A9/A4a, con respecto sus líneas hermanas 35S:A9. Estos resultados demuestran que la sobreexpresión conjunta de los factores *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* en plántulas de tabaco mejora el fenotipo de tolerancia a deshidratación severa previamente descrito para la sobreexpresión de *HaHSFA9* (Prieto-Dapena *et al.*, 2008).

### 2.5. La sobreexpresión ectópica conjunta de *HaHSFA4a* y *HaHSFA9* mejora la tolerancia a estrés oxidativo severo en las plántulas 35S:A9/A4a.

Las plántulas que sobreexpresan ectópicamente el factor *HaHSFA9* mostraron tolerancia a tratamientos de estrés oxidativo severo (ver **Figura r9**). A continuación, estudiamos el efecto de la sobreexpresión ectópica conjunta de *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* en las plántulas 35S:A9/A4a sobre la tolerancia dicho estrés. Para ello, sometimos a las plántulas 35S:A9/A4a, así como a sus respectivas hermanas 35S:A9, a tratamientos con altas concentraciones de  $H_2O_2$  (200 o 300 mM



**Figura r23.** La sobreexpresión conjunta *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* en las plántulas 35S:A9/A4a mejora la tolerancia frente a deshidratación severa observada en las plántulas 35S:A9. Comparación de la supervivencia frente a tratamientos de deshidratación DT2 entre plántulas de 3-4 semanas dobles transgénicas 35S:A9/A4a (A9/A4a) y sus hermanas transgénicas simples 35S:A9 (A9). Datos correspondientes a 13 experimentos independientes y 3-4 repeticiones por experimento, con 4 líneas 35S:A9/A4a (A9<sub>1</sub>/A4a<sub>1</sub>, A9<sub>1</sub>/A4a<sub>2</sub>, A9<sub>2</sub>/A4a y A9<sub>3</sub>/A4a) y sus correspondientes líneas hermanas 35S:A9 (A9<sub>1</sub>, A9<sub>2</sub>, A9<sub>3</sub>). **(A)** Porcentaje de supervivencia de plántulas completas (Supervivencia Plántulas) o de plántulas con al menos una hoja viva (Supervivencia Hojas). Resultados cuantificados después de 7 días de recuperación tras los tratamientos de deshidratación. Entre paréntesis se indica el número de medidas correspondiente a cada valor promedio. **(B)** Fotografía representativa de la supervivencia tras los tratamientos DT2, correspondiente a una línea doble transgénica 35S:A9/A4a (A9<sub>3</sub>/A4a) y su correspondiente línea hermana transgénica simple (A9<sub>3</sub>). Las fotografías se tomaron después de 7 días de recuperación tras el tratamiento. El asterisco (\*) indica diferencias estadísticamente significativas  $P < 0,001$ .

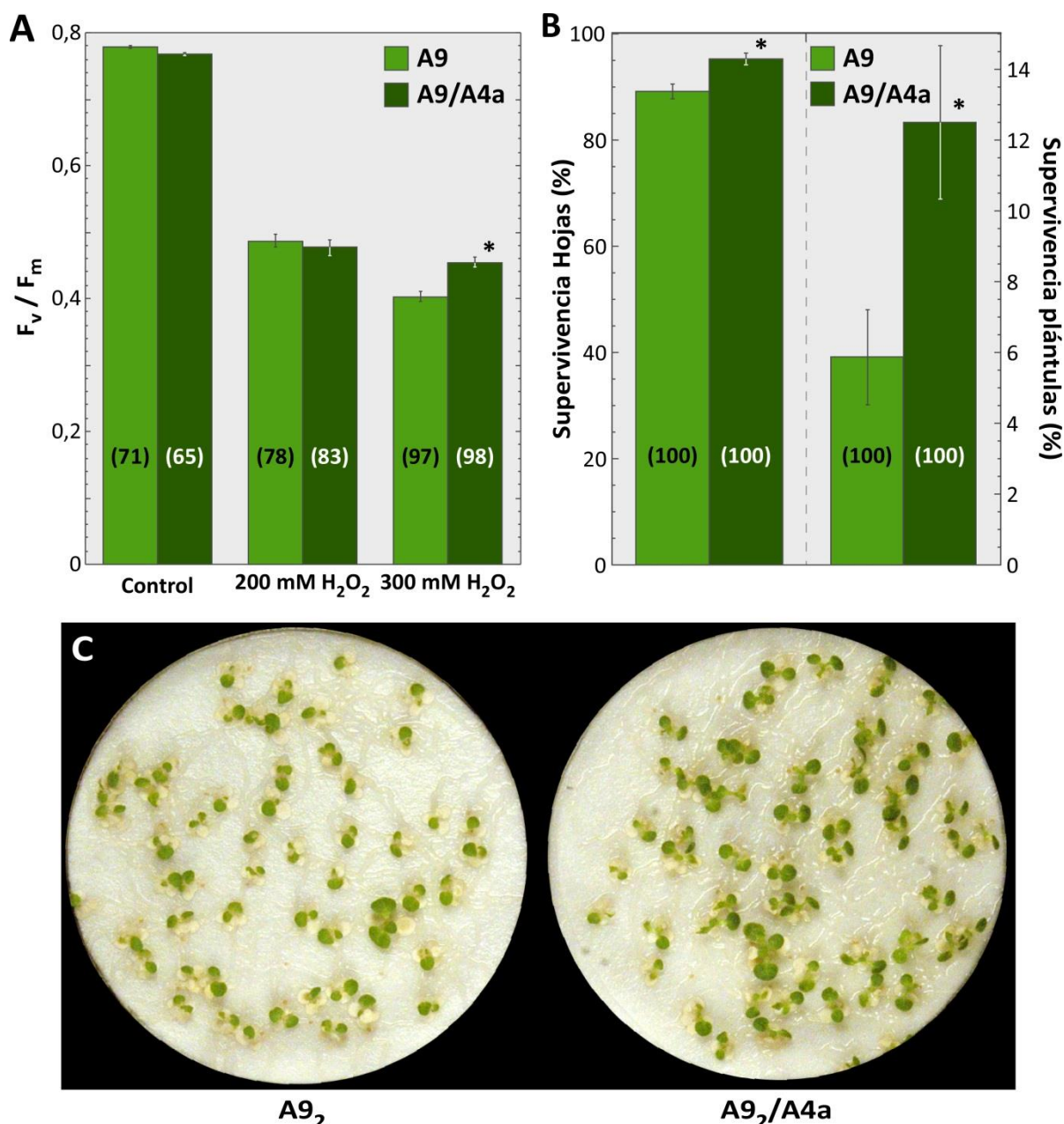
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 24 horas en oscuridad. Tras el tratamiento, se eliminó completamente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y se dejaron recuperar las plántulas durante un periodo de 7 días. Analizamos la integridad del PSII mediante la medida de  $F_v/F_m$  inmediatamente tras el tratamiento, así como la supervivencia de las plántulas después de 7 días de recuperación tras el tratamiento (**Figura r24**). Los tratamientos con 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> redujeron por igual el valor de  $F_v/F_m$  en las plántulas 35S:A9/A4a y 35S:A9 ( $F_v/F_m = 0,477 \pm 0,012$  y  $0,487 \pm 0,010$ , respectivamente;  $F = 0,236$ ;  $P = 0,6278$ ). Además, prácticamente el 100 % de las plántulas sobrevivieron a los tratamientos con 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tras tratamientos con 300 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, las plántulas 35S:A9/A4a mostraron mayor  $F_v/F_m$  que sus hermanas 35S:A9 ( $F_v/F_m = 0,455 \pm 0,008$  y  $0,403 \pm 0,008$ , respectivamente). Si comparamos estos resultados con los valores obtenidos en los tratamientos control, observamos que, tras los

tratamientos con 300 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el valor de  $F_v/F_m$  en las plántulas 35S:A9/A4a se redujo al 59,25 % del valor en condiciones control, mientras que en las plántulas 35S:A9 se redujo al 51,76 %. Esta diferencia es estadísticamente significativa ( $F=23,215$ ;  $P=0,0001$ ), e indica mayor integridad del PSII en las plántulas 35S:A9/A4a que en las líneas 35S:A9, tras los tratamientos con 300 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, (**Figura r24A**). También observamos una mejora de la supervivencia de las plántulas 35S:A9/A4a, con respecto a las plántulas 35S:A9, después de 7 días de recuperación tras dichos tratamientos (**Figura r24B y C**). Observamos un ligero aumento en el porcentaje de plántulas que conservaron al menos una hoja viva ( $95,34 \pm 1,19$  % en 35S:A9/A4a y  $89,19 \pm 1,38$  % en 35S:A9). Además, mientras que un  $12,49 \pm 2,17$  % de las plántulas 35S:A9/A4a sobrevivieron a los tratamientos con 300 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en las líneas 35S:A9 sólo lo hicieron el  $5,87 \pm 1,35$  % de las plántulas. Esta mejora de la supervivencia de la plántula completa en las líneas 35S:A9/A4a, con respecto a sus líneas hermanas 35S:A9, es estadísticamente significativa ( $t=-2,5906$ ;  $P=0,01$ ), y supuso un aumento de 2 veces la supervivencia de la plántula completa en las líneas 35S:A9/A4a, con respecto a las 35S:A9. Estos resultados demuestran que la sobreexpresión conjunta de los factores *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* en las plántulas 35S:A9/A4a mejora el fenotipo de tolerancia a estrés oxidativo severo previamente descrito para la sobreexpresión de *HaHSFA9* en las plántulas 35S:A9 (ver **Figura r9A y B**).

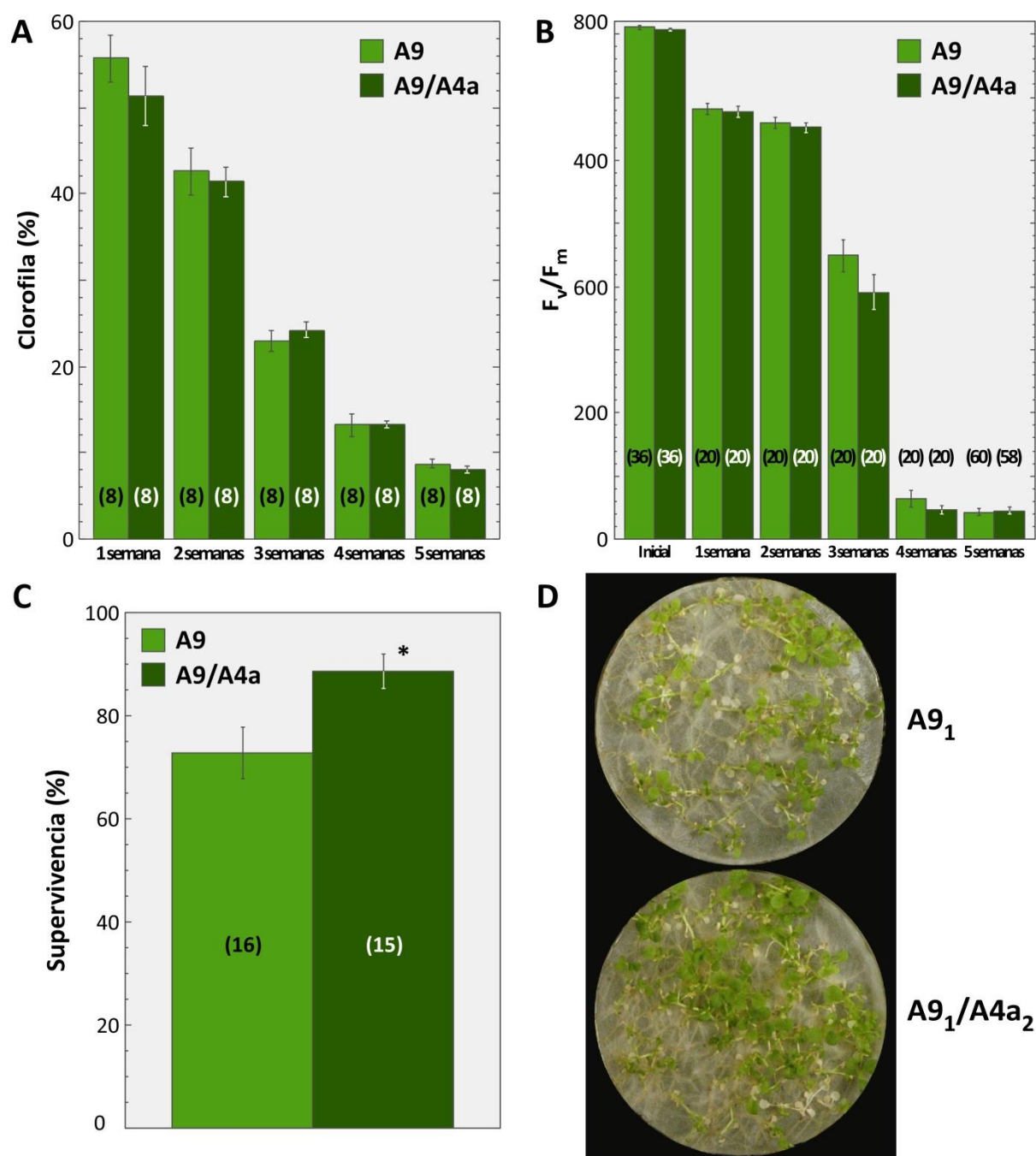
### 2.6. La sobreexpresión ectópica conjunta de *HaHSFA4a* y *HaHSFA9* mejora la tolerancia a tratamientos que inducen la senescencia vegetativa en las plántulas 35S:A9/A4a.

Las plántulas que sobreexpresan ectópicamente el factor *HaHSFA9* mostraron un retardo de la senescencia vegetativa inducida por distintos tratamientos (ver **Figuras r11 y r12**). Por ello, también estudiamos el efecto de la sobreexpresión ectópica conjunta de *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* en las plántulas 35S:A9/A4a sobre el proceso de inducción de dicha senescencia. Para estudiar la posible mejora de este fenotipo, se indujo el proceso de senescencia en las plántulas dobles transgénicas 35S:A9/A4a y sus hermanas transgénicas simples 35S:A9 mediante el cultivo bajo condiciones de oscuridad continua y falta de nutrientes (ver por ejemplo Carrión *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2008). Las plántulas se incubaron sobre papeles humedecidos con H<sub>2</sub>O desionizada y oscuridad continua, durante un periodo máximo de 5 semanas. Para analizar el desarrollo del proceso de senescencia, cuantificamos la pérdida de pigmentos fotosintéticos y el valor de  $F_v/F_m$  durante los tratamientos en la oscuridad (**Figura r25**). A lo largo del tratamiento, no se





**Figura r24.** La sobreexpresión conjunta de *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* en las plántulas 35S:A9/A4a mejora la tolerancia frente a estrés oxidativo severo observada en las plántulas 35S:A9. Comparación entre las plántulas de 3-4 semanas dobles transgénicas 35S:A9/A4a (A9/A4a) y sus hermanas transgénicas simples 35S:A9 (A9), tras tratamientos con  $H_2O$  (Control), o con 200 mM y 300 mM  $H_2O_2$ , durante 24h en oscuridad. Datos correspondientes a 11 experimentos independientes y 2-3 repeticiones por experimento, con 4 líneas 35S:A9/A4a (A9<sub>1</sub>/A4a<sub>1</sub>, A9<sub>1</sub>/A4a<sub>2</sub>, A9<sub>2</sub>/A4a y A9<sub>3</sub>/A4a) y sus correspondientes hermanas 35S:A9 (A9<sub>1</sub>, A9<sub>2</sub>, A9<sub>3</sub>). Entre paréntesis se indica el número de medidas correspondiente a cada valor promedio. **(A)** Efectos sobre el rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ), inmediatamente tras el tratamiento. **(B)** Porcentaje de supervivencia de plántulas completas (Supervivencia Plántulas) o de plántulas con al menos una hoja viva (Supervivencia Hojas), tras el tratamiento con 300 mM  $H_2O_2$ . Resultados cuantificados después de 7 días de recuperación tras los tratamientos. **(C)** Fotografía representativa de la supervivencia tras los tratamientos con 300 mM  $H_2O_2$ , correspondiente a una línea doble transgénica 35S:A9/A4a (A9<sub>2</sub>/A4a) y su línea hermana transgénica simple 35S:A9 (A9<sub>2</sub>). La fotografía se tomó después de 7 días de recuperación tras el tratamiento. El asterisco (\*) indica diferencias estadísticamente significativas  $P < 0,01$ .



**Figura r25. Tolerancia de las plántulas 35S:A9/A4a a tratamientos que inducen de la senescencia.** Comparación de la aparición de senescencia entre las plántulas de 3-4 semanas 35S:A9/A4a ( $A9/A4a$ ) y sus hermanas 35S:A9 ( $A9$ ), tras tratamientos en la oscuridad con falta de nutrientes. Datos correspondientes a 3 experimentos independientes y 1-2 repeticiones por experimento, con 4 líneas dobles transgénicas 35S:A9/A4a ( $A9_1/A4a_1$ ,  $A9_1/A4a_2$ ,  $A9_2/A4a$  y  $A9_3/A4a$ ) y sus correspondientes líneas hermanas transgénicas simples 35S:A9 ( $A9_1$ ,  $A9_2$ ,  $A9_3$ ). **(A)** Reducción de pigmentos fotosintéticos tras 1-5 semanas de tratamiento. Valores correspondientes al porcentaje de pigmentos en relación a la cantidad de pigmento inicial. **(B)** Rendimiento cuántico máximo del PSII ( $F_v/F_m$ ). **(C)** Porcentaje de supervivencia después de 10 días de recuperación tras 5 semanas de tratamiento en la oscuridad. El asterisco (\*) indica una diferencia estadísticamente significativa ( $t=2,60$ ;  $P=0,015$ ). **(D)** Fotografía representativa de la supervivencia tras 5 semanas de tratamiento, correspondiente a una línea doble transgénica 35S:A9/A4 ( $A9_1/A4a_2$ ) y su línea hermana transgénica simple 35S:A9 ( $A9_1$ ). Entre paréntesis se indica el número de medidas correspondiente a cada valor promedio.



observaron diferencias significativas en la pérdida de clorofila entre las plántulas 35S:A9/A4a y 35S:A9 (por ejemplo, a las 3 semanas de tratamiento en la oscuridad  $F=0,038$ ;  $P=0,849$ ) (**Figura r25A**). Tampoco se observaron diferencias significativas entre las plántulas 35S:A9/A4a y 35S:A9 en la disminución del valor de  $F_v/F_m$ , durante las 5 semanas de tratamiento (por ejemplo, a las 3 semanas de tratamiento en la oscuridad  $F=2,313$ ;  $P=0,137$ ) (**Figura r25B**). Sin embargo, después de 10 días de recuperación tras 5 semanas de tratamiento en oscuridad, el  $88,70 \pm 3,40\%$  de las plántulas 35S:A9/A4a se recuperaron, frente al  $72,78 \pm 5,08\%$  observado en las plántulas 35S:A9 (**Figura r25C y D**). Este aumento de la supervivencia de las plántulas 35S:A9/A4a, en comparación con las plántulas 35S:A9, es estadísticamente significativo ( $t=-2,60$ ;  $P=0,015$ ), y se debió a la generación de nuevo material, observándose la despigmentación y muerte del material antiguo. Estos resultados demuestran que la sobreexpresión ectópica conjunta de los factores *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* en las plántulas 35S:A9/A4a mejora la recuperación de la planta tras los tratamientos de inducción de senescencia, con respecto a las plántulas 35S:A9.

### C. Identificación de otros genes activados por el factor *HaHSFA9*.

La sobreexpresión ectópica del factor *HaHSFA9* en plántulas de tabaco confiere gran variedad de fenotipos. Las plántulas 35S:A9 han mostrado una mayor estabilidad de las membranas celulares, así como distintos efectos positivos sobre la maquinaria fotosintética bajo condiciones normales de cultivo (ver Figuras r5 y r6). La sobreexpresión ectópica de *HaHSFA9* también confiere a la plántula tolerancia a condiciones extremas de deshidratación y de estrés oxidativo, observándose la protección del aparato fotosintético bajo estas condiciones (ver Figuras r7 y r9). Además, también se ha demostrado el retardo de la senescencia vegetativa en las plántulas 35S:A9 (ver Figuras r11 y r12). Esto nos sugiere que el programa genético activado por *HaHSFA9* podría estar implicado en regular la expresión de otros genes distintos a los genes *hsp*. Para identificar estos genes, aislamos mediante hibridación sustractiva los genes inducidos por el programa genético activado por el factor *HaHSFA9* en las plántulas 35S:A9, y comprobamos su inducción mediante RT-qPCR.

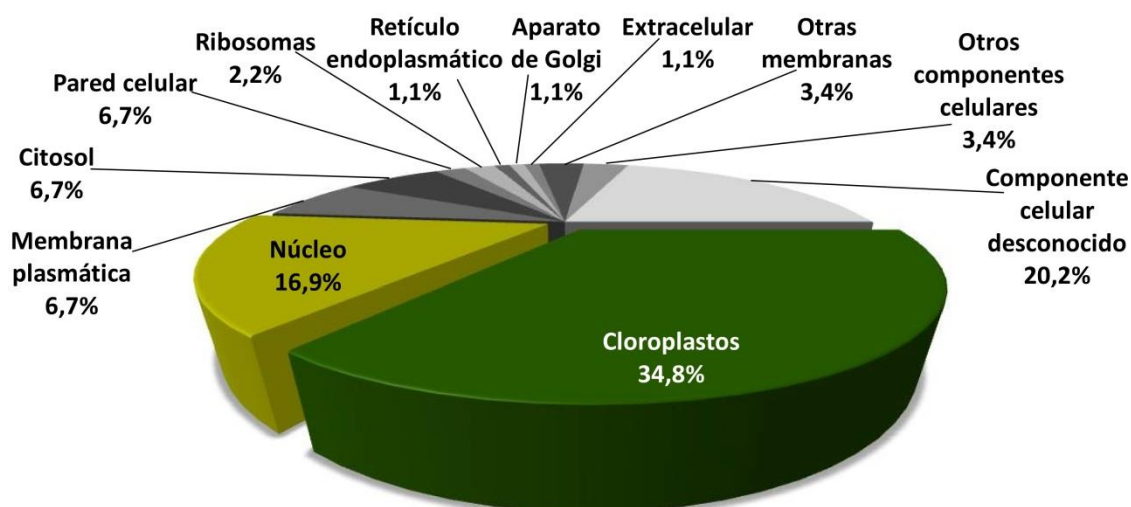
#### 1. Obtención de la genoteca por hibridación sustractiva.

La hibridación sustractiva es una poderosa técnica que permite comparar dos poblaciones de ARNm y obtener clones de los genes cuyos ARNm se acumulan en una de las poblaciones, pero no en la otra. Mediante esta técnica, obtuvimos una genoteca de ADNc enriquecida en los genes con expresión inducida en las plántulas 35S:A9, con respecto a las plántulas NT. Posteriormente, comprobamos la eficiencia de la sustracción mediante RT-qPCR, comparando la abundancia del gen *HaHSFA9* entre el producto de la sustracción y la muestra 35S:A9 sin sustraer. Como control interno, usamos el gen de la proteína ribosomal L25. Observamos que el cDNA correspondiente a *HaHSFA9* se enriqueció 200 veces en el producto de la sustracción, con respecto a la muestra no sustraída, lo cual nos indica que la sustracción se llevó a cabo con éxito.

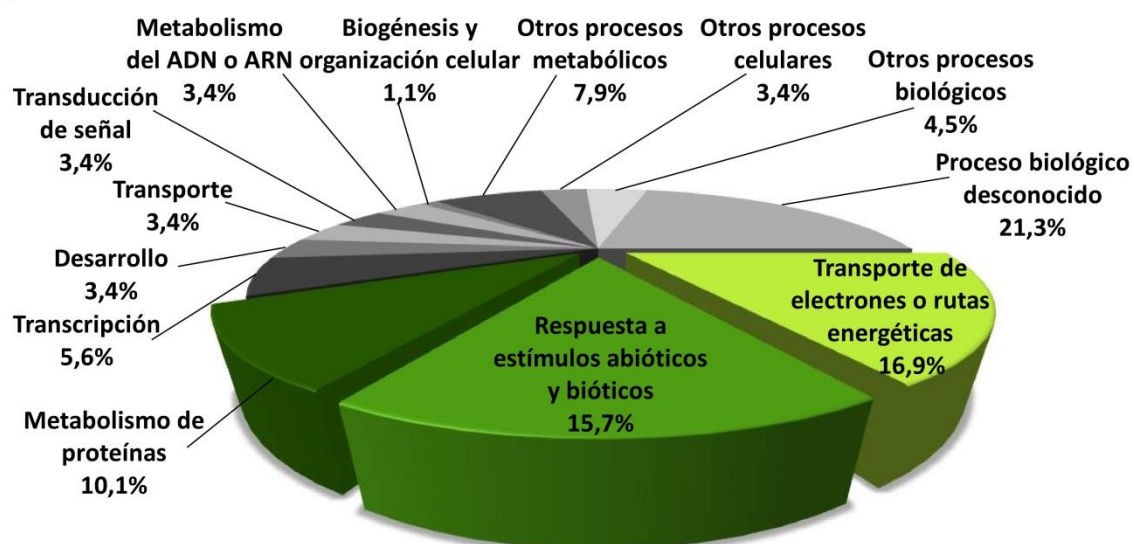
#### 2. Análisis y selección de clones.

Los ADNc resultantes de la sustracción se ligaron al vector de expresión pGEM®-T Easy (Promega). Posteriormente se introdujeron en *E.coli* mediante transformación, y se aislaron 116

A



B



**Figura r26. Agrupación funcional de los genes aislados por SSH en las plántulas 35S:A9.** Clasificación por ontología genética de los genes aislados por SSH en las plántulas 35S:A9 en distintas categorías funcionales según la homología de su secuencia. **(A)** Distribución de los genes en función de su localización celular. **(B)** Distribución de los genes en función al proceso biológico en el que participan. Los porcentajes se calcularon sobre el número total de secuencias útiles (n=89).

de los clones resultantes. Estos clones se secuenciaron, usando como cebador el oligonucleótido T7. Las secuencias obtenidas se analizaron por homología mediante BLAST. El 6,9 % de las secuencias se descartaron por problemas de secuenciación. Además, el 16,4 % se correspondían con genes ya repetidos. Así, de las 116 secuencias analizadas, obtuvimos 89 genes distintos, posiblemente inducidos en las plántulas 35S:A9. Estos 89 genes caracterizados se clasificaron por

ontología genética usando como referencia la base de datos *online* para Arabidopsis TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*). Establecimos dos clasificaciones, basándonos en la localización celular o en el proceso biológico en el que participan los productos génicos (**Figura r26**, la clasificación detallada se muestra en el **Anexo I**). Atendiendo al componente celular, un 34,8 % de los genes se identificaron como productos génicos localizados en los cloroplastos, y un 16,9 % como productos génicos con localización nuclear (**Figura r26A**). En función del proceso biológico en el que participan, un 16,9 % de los genes se caracterizaron como genes implicados en el transporte de electrones o rutas energéticas, un 15,7 % se clasificaron como genes relacionados con respuesta a estímulos abióticos o bióticos, y un 10,1 % se correspondían con genes implicados en el metabolismo de proteínas (**Figura r26B**). Cabe destacar que, todos los genes clasificados como genes implicados en el transporte de electrones y rutas energéticas compartían localización plastidial, entre los que se encontraban mayoritariamente componentes del PSI y el PSII, así como subunidades de la ATP sintasa y el citocromo *b<sub>6</sub>f*. Además, los componentes relacionados con la respuesta a estrés se localizaban principalmente en el cloroplasto y las membranas celulares. Estos resultados son consistentes con la mejora de la estabilidad de las membranas celulares, así como con la mejora de la maquinaria fotosintética observada en condiciones normales de cultivo en las plántulas 35S:A9.

### 3. Comprobación de la inducción de los genes candidatos en las plántulas 35S:A9.

Atendiendo a los resultados anteriores, comprobamos por RT-qPCR la inducción de 30 de los genes clonados y caracterizados a partir de la genoteca de sustracción, centrando nuestra atención principalmente en los genes relacionados con la fotosíntesis, que podrían ayudar a comprender mejor los fenotipos descritos previamente para las plántulas 35S:A9 (**Tabla r1**). Además, añadimos como control el gen *psbA*, correspondiente a la proteína D1 del PSII, la cual se acumula a mayores niveles en las plántulas 35S:A9 bajo condiciones normales de cultivo (ver **Figura 6C**). Para cada uno de los 30 genes seleccionados, diseñamos la pareja correspondiente de oligonucleótidos específicos. Los resultados de la RT-qPCR se normalizaron usando 3 genes como referencia interna: el factor de elongación EF-1a, la proteína ribosomal L25 y la enzima de conjugación de la ubiquitina E2 (*Ntubc2*). Para cada uno de los 3 controles internos se usó la correspondiente pareja de oligonucleótidos específicos descrita previamente por Schmidt & Delaney (2010). Se comprobó la especificidad de los oligonucleótidos mediante una curva de

**Tabla r1. Genes analizados por RT-qPCR.** Selección de los genes aislados por SSH para el análisis de la inducción en las plántulas 35S:A9 mediante RT-qPCR. Se resaltan los genes con inducción superior a 1,5 (sombreado rojo) y 2,0 veces (sombreado azul), en las plántulas 35S:A9.

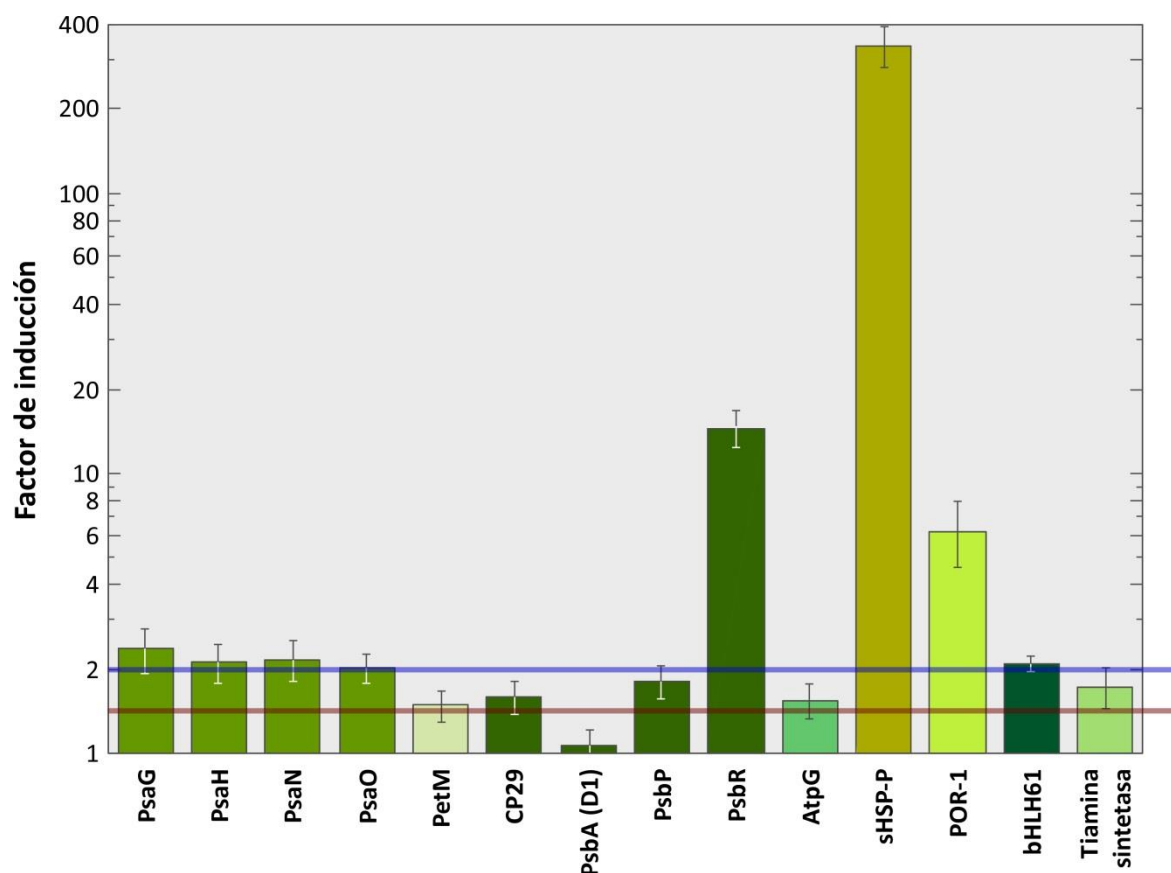
Genes	F. inducción	Descripción **
<b>CP47 (PsbB)</b>	1,4 ± 0,2	Proteína de unión a clorofilas (CP), componente del RC del PSII. Implicado en el ensamblaje del PSII.
<b>PsbI</b>	0,8 ± 0,1	Subunidad del PSII codificada por el genoma plastidial. Implicada en la biogénesis del PSII.
<b>PsbH</b>	1,3 ± 0,2	Subunidad del PSII codificada por el genoma plastidial. Posiblemente implicado en la reparación del PSII tras la fotoinhibición.
<b>PsbO1</b>	1,4 ± 0,1	Subunidad extrínseca del PSII, componente estructural del complejo OEC.
<b>PsbP</b>	1,8 ± 0,2	Subunidad extrínseca del PSII, componente estructural del complejo OEC. Necesaria para el ensamblaje y estabilización del PSII.
<b>PsbR</b>	14,3 ± 2,2	Subunidad extrínseca del PSII, componente estructural del complejo OEC. Necesaria para el ensamblaje del PSII.
<b>PsbX</b>	1,3 ± 0,2	Subunidad de bajo peso molecular del PSII. Importante para la acumulación de PSII funcional.
<b>CP29</b>	1,6 ± 0,2	Proteína de unión a clorofila <i>a/b</i> . Componente minoritario del LHCII.
<b>PetM</b>	1,5 ± 0,2	Subunidad del citocromo <i>b<sub>6</sub>f</i> . Implicada en la transferencia de electrones desde el PSII al PSI.
<b>Ycf3</b>	1,1 ± 0,1	Proteína implicada en el ensamblaje del PSI.
<b>PsaG</b>	2,4 ± 0,4	Componente del RC del PSI. Permite el anclaje del complejo LHCI al PSI.
<b>PsaH</b>	2,1 ± 0,4	Componente del RC del PSI. Implicado en la interacción del PSI con el complejo LHCII.
<b>PsaN</b>	2,2 ± 0,4	Componente del RC del PSI. Posiblemente implicada en la unión de la plastocianina al PSI.
<b>PsaO</b>	2,0 ± 0,2	Componente del RC del PSI. Implicado en la interacción del PSI con el complejo LHCII.
<b>AtpB</b>	1,3 ± 0,2	Subunidad CF <sub>1</sub> -β de la ATP sintasa cloroplástica.
<b>AtpD</b>	1,4 ± 0,2	Subunidad δ de la ATP sintasa cloroplástica. Codificada por el genoma plastidial.
<b>AtpE</b>	1,3 ± 0,2	Subunidad CF <sub>1</sub> -ε de la ATP sintasa cloroplástica. Codificada por el genoma plastidial.
<b>AtpG</b>	1,5 ± 0,2	Subunidad CF <sub>0</sub> -II de la ATP sintasa cloroplástica.
<b>sHSP-P</b>	338 ± 57	Proteína de choque térmico sHSP de localización plastidial.
<b>POR-1</b>	6,2 ± 1,7	NADPH-protoclorofilida oxidoreductasa 1. Enzima implicada en la ruta de biosíntesis de la clorofila.
<b>Tiamina Sintetasa</b>	1,7 ± 0,3	Enzima implicada en la síntesis de tiamina o vitamina B <sub>1</sub> . Se ha sugerido que el metabolismo de la tiamina esté implicado en la protección contra diversos estreses.
<b>Tiorredoxina <i>m</i></b>	1,2 ± 0,1	Tiorredoxina cloroplástica con actividad dependiente de la luz. Reduce puentes disulfuros de proteínas dianas. Se ha sugerido su función chaperona frente a estrés oxidativo.
<b>PEPC</b>	1,2 ± 0,1	Fosfo-enol-piruvato carboxilasa. Enzima implicada en la fijación de CO <sub>2</sub> .
<b>Ribulosa-fostato Epimerasa</b>	1,3 ± 0,2	Enzima implicada en el ciclo de Calvin.
<b>Rubredoxina (similar)</b>	1,2 ± 0,2	Proteína similar a la rubredoxina. Se ha sugerido que las rubredoxinas específicas de los tilacoides son necesarias para la actividad normal del PSII.
<b>bHLH61</b>	2,1 ± 0,1	Factor de transcripción perteneciente a la familia de factores MYC R, esenciales para la diferenciación y el desarrollo de la planta.
<b>LRR quinasa</b>	1,2 ± 0,2	Proteína quinasa de los receptores LRR. Posiblemente implicada en la ruta de transducción de señal de respuesta frente a estrés osmótico en plantas.
<b>SAP1/SAP5 (similar)</b>	1,1 ± 0,1	Proteína similar a las proteínas asociadas a estrés SAP1 y SAP5. Las proteínas SAP confieren tolerancia a estrés en plantas.
<b>MYB1</b>	1,3 ± 0,1	Factor de transcripción MYB. Regula el metabolismo de la lignina. Posiblemente relacionado con la respuesta a estrés abiótico.
<b>NDPK II</b>	1,2 ± 0,2	Nucleosido difosfato quinasa. En plantas, implicadas en la embriogénesis y desarrollo de la semilla, así como en la respuesta a luz azul y alta fuerza iónica.

\*\* Para más detalles, ver **Anexo I**.

disociación (60-95 °C), observándose para cada pareja de oligonucleótidos un único amplicón con una única curva de disociación. La inducción de cada gen se comprobó mediante RT-qPCR, analizando 3 réplicas biológicas, con 2-3 repeticiones técnicas por réplica biológica, correspondientes a los ADNc de plántulas de una línea 35S:A9 (A9<sub>1</sub>) y su correspondiente línea hermana NT (NT<sub>1</sub>). Posteriormente, los valores correspondientes a la expresión de cada gen se normalizaron en función de cada uno de los 3 genes de referencia interna. Calculamos el factor de inducción de cada gen en las muestras 35S:A9 como la relación entre la abundancia del ADNc correspondiente en las muestras 35S:A9 y NT (**Figura r27**; valores de inducción en **Tabla r1**). Considerando como umbral un factor de inducción igual o superior a 1,5 (es decir, una inducción del gen de al menos 1,5 veces en las muestras 35S:A9 con respecto a las NT), 13 de los 30 genes analizados mostraron inducción en las plántulas 35S:A9 (**Figura r27**, línea roja). En 8 de estos 13 genes, la inducción fue mayor a 2 veces (**Figura r27**, línea azul). Entre estos genes inducidos en las plántulas 35S:A9 se encontraron componentes de los cuatro complejos proteicos encargados de catalizar la transferencia de electrones y la transducción de energía fotosintética (PSII, citocromo *b<sub>6</sub>f*, PSI y ATP sintasa). Así, encontramos inducidos genes codificantes de componentes de los fotosistemas, como las subunidades del PSI: PsaG, PsaH, PsaN y PsaO, las subunidades del PSII: PsbP y PsbR, la proteína LHC del PSII: CP29, la subunidad PetM del citocromo *b<sub>6</sub>f* y la subunidad CF<sub>0</sub>-II de la ATP sintasa cloroplástica. La inducción observada a nivel de ARNm de la proteína PsbP, componente del complejo OEC del PSII, es consistente con el aumento observado a nivel de proteínas mediante *western blot* en las plántulas 35S:A9 (ver **Figura r6**). Sin embargo, no se observó inducción a nivel ARNm del gen codificante de la proteína D1 (PsbA, factor de inducción =  $1,1 \pm 0,2$ ). Por otro lado, confirmamos la inducción a nivel de ARNm en las plántulas 35S:A9 del gen *shsp-P*, estudiado anteriormente a nivel de acumulación de proteína (ver **Figura r2**). Además, encontramos inducción del factor de transcripción bHLH61. Los bHLH constituyen una amplia familia de factores de transcripción esenciales para la diferenciación y desarrollo de la planta (ver por ejemplo Li *et al.*, 2006, Carretero-Paulet *et al.*, 2010). También observamos la inducción en las plántulas 35S:A9 de las enzimas tiamina sintetasa y POR-1. Ambas enzimas están localizadas en los cloroplastos. La NADH:protochlorophyllide oxidoreductase (POR-1) es una enzima esencial para la biosíntesis de clorofila dependiente de luz (Buhr *et al.*, 2008).

Estos resultados confirman que la sobreexpresión ectópica del programa genético activado por el factor *HaHSFA9* en plántulas de tabaco induce la expresión de genes distintos a los *hsp*,

entre los que se encuentran componentes de los fotosistemas, así como genes implicados en el desarrollo de la maquinaria fotosintética. La inducción de estos genes podría contribuir a los fenotipos de tolerancia frente a estreses abióticos extremos observados en plántulas 35S:A9.



**Figura r27. Aumento de la acumulación de ARNm en las plántulas 35S:A9.** Comparación mediante RT-qPCR de los niveles de inducción de genes aislados a partir de la genoteca de sustracción SSH, entre las plántulas de 3-4 semanas 35S:A9 y sus hermanas NT. Se representa el factor de inducción en las líneas 35S:A9, calculado como el cociente entre la acumulación de ARNm de cada gen en las plántulas 35S:A9 y NT. Estudios realizados a partir de los ARNm de plántulas de una línea homocigótica 35S:A9 (A9<sub>1</sub>) y su correspondiente línea hermana no transgénica (NT<sub>1</sub>). Datos correspondientes a los valores promedio obtenidos con 3 réplicas biológicas por línea y 2-3 repeticiones técnicas por cada réplica biológica, en función de 3 genes de referencia interna. Las líneas roja y azul indican los umbrales de inducción por encima de 1,5 y 2,0 veces, respectivamente.





## Discusión



En trabajos previos de nuestro laboratorio se caracterizó un programa genético activado en semillas por factores HSF, en el que juega un papel importante el factor *HaHSFA9*, y que incluye la expresión de genes *hsp*. Este programa genético, al que denominamos “programa activado por HSFA9”, está conservado en semillas de plantas como girasol (Almoguera *et al.*, 2002; Prieto-Dapena *et al.*, 2006) y *Arabidopsis* (Kotak *et al.*, 2007). Antes de nuestro trabajo se describieron indicios de que otros factores HSF de clase A pudieran participar junto a *HaHSFA9* en la activación de dicho programa genético en semillas de girasol (Tejedor-Cano *et al.*, 2010; Carranco *et al.*, 2010). Aunque el número de estos HSF adicionales se desconoce actualmente, otros resultados de nuestro laboratorio indicaron que el factor *HaHSFA4a* podría ser uno de dichos HSF (Tejedor-Cano *et al.*, 2014). El programa genético activado por HSFA9 opera sólo durante el desarrollo de la semilla, antes de las últimas etapas de la embriogénesis cigótica. Sin embargo, la activación ectópica de este programa en tejidos vegetativos, mediante la sobreexpresión de *HaHSFA9* en plántulas transgénicas de tabaco, confirió fenotipos de tolerancia a deshidratación severa (Prieto-Dapena *et al.*, 2008).

Con nuestro trabajo, hemos extendido nuestro conocimiento sobre el programa genético activado por HSFA9. Hemos demostrado que la sobreexpresión ectópica de *HaHSFA9* en plántulas de tabaco mejora la estabilidad de las membranas celulares (ver **Figura r5**), confiere tolerancia a estreses abióticos extremos mediante la protección del aparato fotosintético (ver **Figuras r7 y r9**), y retarda el proceso natural de senescencia de la hoja (ver **Figuras r11 y r12**). Además, hemos confirmado al factor *HaHSFA4a* como uno de los posibles HSF de clase A que, junto a *HaHSFA9*, co-activan el programa genético implicado en la tolerancia frente a estreses abióticos extremos. Así, hemos demostrado que la sobreexpresión ectópica conjunta de *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* en plántulas transgénicas de tabaco mejora los fenotipos previamente descritos para la sobreexpresión ectópica de *HaHSFA9* (ver por ejemplo **Figura r23 y r24**). Estos fenotipos se correlacionan con la acumulación de proteínas HSP, como las sHSP-P, especialmente analizadas en nuestro estudio. Asimismo, en este trabajo, hemos identificado otros genes, distintos a los genes *hsp*, cuya expresión se induce al sobreexpresar ectópicamente *HaHSFA9* en plántulas de tabaco (ver **Figura r27**). La inclusión tentativa de estos genes como parte del programa genético activado por *HaHSFA9* nos permite comprender mejor la gran complejidad de efectos fenotípicos derivados de la sobreexpresión ectópica de dicho programa

en tejido vegetativo. Nuestro trabajo ha permitido adicionalmente encontrar y entender nuevos fenotipos (como el retardo de la senescencia vegetativa), y predecir que la sobreexpresión ectópica de *HaHSFA9* causaría un efecto fotomorfogénico.

El programa genético activado por HSFA9 es específico de semillas, por lo que nuestros resultados (obtenidos mediante sobreexpresión ectópica en plántulas) permiten inferir por analogía que dicho programa genético contribuye a la protección del aparato fotosintético embrionario durante la embriogénesis cigótica (dentro de las semillas). Esta propuesta se basa en la protección observada en las plántulas 35S:A9 bajo las condiciones de deshidratación (y estrés oxidativo) severas usadas en nuestro estudio, las cuales son similares a las que ocurren durante el proceso de desecación embrionaria. Nuestros resultados sugieren que el programa genético activado por HSFA9 en semillas participa en la protección de las membranas celulares, así como de los plástidos no fotosintéticos y otros plástidos, especialmente los proplástidos que se transforman en cloroplastos (plástidos fotosintéticos) tras sobrevivir a la desecación embrionaria en la semilla (Jarvis & López-Juez, 2013). Dicha protección podría contribuir a mantener funciones esenciales para la supervivencia, tanto durante la embriogénesis como en las primeras etapas de la germinación, como la síntesis de aminoácidos, ácidos grasos, lípidos polares y carbohidratos, especialmente en los plástidos. El efecto protector del aparato fotosintético en desarrollo (en los proplástidos) se complementaría con otros efectos sobre la biogénesis de los cloroplastos causados por nuevos genes activados por *HaHSFA9* identificados tentativamente en nuestro trabajo. Ambos efectos serían complementarios y facilitarían que se reanudara la diferenciación de los cloroplastos funcionales durante la germinación de la plántula, a partir de los plástidos parcialmente ensamblados que resisten la desecación embrionaria en las semillas Jarvis & López-Juez, (2013).

### *El programa genético activado por HSFA9 incluye genes que codifican proteínas sHSP-P.*

En estudios anteriores de nuestro laboratorio se observó que la sobreexpresión ectópica del factor *HaHSFA9* en plántulas transgénicas de tabaco confería tolerancia a deshidratación severa, especialmente observada en la supervivencia de la parte aérea de la plántula. Esto se correlacionó con la acumulación de proteínas HSP en las plántulas 35S:A9, entre las que se incluían las proteínas HSP101, sHSP-CI, y sHSP-CII (Prieto-Dapena *et al.*, 2008). La comparación

de los patrones de acumulación de proteínas sHSP, indicó que existía un solapamiento parcial y diferencias cruciales entre los genes *hsp* activados ectópicamente *HaHSFA9* y los activados por aclimatación al calor. Así, la sobreexpresión ectópica de genes *hsp* activados por *HaHSFA9* caracterizados como específicos de semillas permitió explicar parcialmente la tolerancia a los tratamientos de deshidratación severa observada en las plántulas 35S:A9. Esto contrasta con lo observado con plántulas no transgénicas aclimatadas al calor, que ni expresan dichos genes *hsp* ni resisten la deshidratación severa (Prieto-Dapena *et al.*, 2008).

Los resultados de nuestro estudio incorporan al programa genético activado por HSFA9 la expresión de proteínas sHSP-P. La inducción de sHSP-P se ha confirmado tanto a nivel de acumulación de proteínas (ver Figuras r2 y r3) como a nivel de acumulación de ARNm (ver Figura r27). Los patrones de acumulación de proteínas sHSP-P inducidas por el programa activado por *HaHSFA9* difieren de los observados por aclimatación al calor, aunque existe un solapamiento parcial entre ambos programas genéticos (ver Figura r3). Además, una parte de estas sHSP-P acumuladas en las plántulas 35S:A9 se encuentran fuertemente asociadas a las membranas tilacoidales bajo condiciones normales de cultivo (ver Figura r4). Así, la expresión ectópica de los diferentes genes *hsp* específicos de semillas, incluyendo las sHSP-P, podrían ayudar a explicar parcialmente la tolerancia observada en las plántulas 35S:A9 frente a estreses abióticos extremos, como la deshidratación severa o condiciones drásticas de estrés oxidativo.

Sin embargo, creemos que la protección conferida por el programa genético activado por el factor HSFA9 no puede atribuirse únicamente a la expresión de genes *hsp*. Todas las sHSP actúan como chaperonas (Sun & MacRae, 2005), incluyendo tanto a las sHSP-P como a las sHSP-CI y sHSP-CII (Sundby *et al.*, 2005; Basha *et al.*, 2010). No obstante, las funciones antioxidantes descritas para las proteínas sHSP en plantas superiores sólo permiten explicar en parte la protección observada en las plántulas 35S:A9 (Härndahl *et al.*, 1999; Barua *et al.*, 2003; Neta-Sharir *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2007). La sobreexpresión de la proteína plastidial HSP21 en *Arabidopsis*, bajo el promotor CaMV 35S, provocó la acumulación de esta proteína en hojas, bajo condiciones normales de cultivo, a niveles mayores a los observados durante aclimatación al calor (Osteryoung & Vierling, 1992). Esto es similar a lo que nosotros observamos para las proteínas sHSP-P inducidas por *HaHSFA9* (ver Figura r2). Sin embargo, la sobreexpresión de HSP21 sólo confirió una protección muy moderada frente al daño producido por estrés oxidativo, combinado con estrés por calor o alta luminosidad (Härndahl *et al.*, 1999). Por lo tanto, la sobreexpresión única de proteínas sHSP-P, no sería suficiente para la compleja

protección observada en las plántulas 35S:A9 frente a condiciones drásticas de estrés. Además, Chauchan *et al.*, (2012) caracterizaron la proteína cloroplástica sHSP26 de trigo, la cual se expresa en tejido vegetativo como respuesta a estrés abiótico, y durante la maduración de la semilla y la germinación. La expresión de sHSP26 en plantas transgénicas de *Arabidopsis* mejoró la tolerancia a altas temperaturas de las plantas, las cuales mostraron mayor actividad fotosintética y mayor retención de pigmentos fotosintéticos que las plantas no transgénicas durante estrés por calor. Sin embargo, bajo condiciones normales de cultivo, estas plantas transgénicas no mostraron una mejora de los parámetros fotosintéticos, entre los que se incluyó  $F_v/F_m$  (Chauchan *et al.*, 2012). Estos resultados contrastan con el aumento de  $F_v/F_m$  observado en las plántulas 35S:A9 bajo condiciones normales de cultivo (ver **Figura r6**).

Por otro lado, la asociación de las distintas sHSP con las membranas disminuye su fluidez y estabiliza las membranas celulares, incluidas las membranas tilacoidales (Török *et al.*, 2001; Tsvetkova *et al.*, 2002; Nakamoto & Vigh, 2007). Así, la expresión de proteínas sHSP podría explicar la mejora de la estabilidad de las membranas celulares observada en las plántulas 35S:A9 (ver **Figura r5**). Las sHSP inducidas por *HaHSFA9* podrían tener efectos, directos o indirectos, sobre las membranas celulares y sobre las diferentes proteínas asociadas a éstas, especialmente en los tilacoides. Además, las membranas son las estructuras celulares más expuestas a estreses externos, por lo que su organización y fluidez son muy sensibles a estrés. De este modo, la estabilización de las membranas celulares podría contribuir en parte a la tolerancia de las plántulas 35S:A9 a condiciones drásticas de deshidratación y estrés oxidativo.

Podemos concluir, que las HSP específicas de semillas, con características distintas a nivel estructural y/o funcional a las expresadas en órganos vegetativos durante aclimatación al calor, podrían contribuir a la protección observada en las plántulas 35S:A9, aunque esto no sería suficiente para explicar la complejidad de los fenotipos descritos en nuestro trabajo para estas plántulas.

***La sobreexpresión ectópica de HaHSFA9 protege la maquinaria fotosintética y confiere tolerancia a las plántulas 35S:A9 frente al daño producido por condiciones drásticas de deshidratación o estrés oxidativo.***

En trabajos anteriores de nuestro laboratorio se discutió sobre los niveles de deshidratación que permitían la supervivencia de la plántula completa en las líneas 35S:A9, en comparación con

semillas, plantas de resurrección y musgos. La tolerancia a deshidratación obtenida en nuestras plántulas no se corresponde con la tolerancia “canónica” a desecación descrita para semillas, plantas de resurrección y musgos. Sin embargo, la deshidratación tolerada por nuestras plántulas es mucho mayor a la observada en otros estudios con plantas normales (ver Prieto-Dapena *et al.*, 2008). Los resultados presentados en la **Figura r9** muestran que las condiciones de estrés oxidativo usadas en nuestro estudio son tan severas como las obtenidas en los tratamientos de deshidratación (ver **Figura r7**). Además, los tratamientos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dañaron tanto componentes del PSII, como componentes del PSI, el cual es considerado resistente a estreses más moderados (Sonoike, 2011). Sin embargo, esta resistencia tanto a deshidratación severa como a estrés oxidativo drástico, no se observa tras tratamientos estándares de aclimatación al calor (ver **Figura r10**, y Prieto-Dapena *et al.*, 2008). Estos tratamientos de aclimatación al calor inducen una respuesta genética compleja, que es suficiente para la tolerancia de los órganos vegetativos a niveles de estrés moderado, pero no son comparables a las condiciones de estrés usadas en nuestro trabajo. La tolerancia a condiciones drásticas de estrés obtenida en nuestro trabajo requiere la expresión, en órganos vegetativos, del programa genético específico de semillas activado por el factor *HaHSFA9* (ver **Figura r10**).

En nuestro estudio, hemos demostrado que la expresión ectópica del factor *HaHSFA9* en plántulas transgénicas de tabaco confiere protección de las membranas fotosintéticas, así como de los fotosistemas PSII y PSI y sus componentes, frente a deshidratación severa y frente al daño producido por estrés oxidativo severo (ver **Figuras r7 y r9**). Esta protección favorece la integridad de los complejos supra-moleculares proteína-clorofila tras el estrés severo, como los supercomplejos del PSII-LHCII o PSI-LHCI. La sustitución de las proteínas dañadas del RC del PSII, en particular para la proteína D1, afecta a la estabilidad de los complejos del PSII en los tilacoides. Así, los complejos se colapsan bajo diferentes condiciones experimentales donde se bloquea la síntesis de proteínas (Aro *et al.*, 2005; Nixon *et al.*, 2010). Esto junto, con otros resultados de nuestro laboratorio no incluidos en esta memoria, sugiere que la protección de la proteína D1 y su sustitución podrían contribuir a explicar la mayor estabilidad de los complejos y supercomplejos del PSII observada durante estrés en las plántulas 35S:A9 (ver las Figuras 5 y 6 en Almoguera *et al.* 2012). Nuestros resultados muestran el efecto contrario al observado con mutantes en los que disminuye la estabilidad de los complejos del PSII, en coincidencia con una reducción de la acumulación/estabilidad de la proteína D1 y una disminución de la tasa de sustitución de la proteína D1 dañada (Armbruster *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2011). Así, la protección

contra el daño producido por estrés oxidativo de la proteína D1 y su reparación en los plástidos podría explicar, en parte, la alta resistencia de los complejos del PSII observada tras la deshidratación en las plántulas 35S:A9. Además, la protección de otras proteínas asociadas a los tilacoides, así como factores de ensamblaje, podrían ser requeridos para explicar la gran complejidad de fenotipos de resistencia a estrés observados en las plántulas 35S:A9.

En algunas plantas de resurrección, pero no en las plantas normales, las proteínas PsaB y D1, así como los complejos de los fotosistemas PSI y PSII, parecen estar protegidos durante tratamientos de deshidratación en oscuridad, similares a los usados en nuestro estudio (Deng *et al.*, 2003; Georgieva *et al.*, 2009). Estas plantas de resurrección, denominadas plantas homoioclorofilas, no desmantelan las membranas fotosintéticas durante la desecación, y su protección implica una limitación en los daños estructurales, a niveles reversibles (Dinakar *et al.*, 2012). Esto podría ser similar a lo observado en las plántulas 35S:A9. Las severas condiciones de deshidratación o estrés oxidativo usadas en nuestro trabajo podrían dañar de forma irreversible tanto el PSII como el PSI de las plántulas NT, las cuales no sobreviven a dichos tratamientos (Ver **Figura r9E**). Además, el PSI carece de una maquinaria de reparación eficiente, por lo que su funcionabilidad en tejidos vegetativos depende estrictamente de los mecanismos de protección (Sonoike, 2011). Estos mecanismos, por el momento sin caracterizar de forma detallada, pueden ser suficientes para tolerar estreses moderados en la mayoría de las plantas (Sonoike, 2011). Las drásticas condiciones de estrés usadas en este trabajo podrían superar la protección normal de los fotosistemas PSI y PSII. Sólo la activación, en las plántulas 35S:A9, de los mecanismos de protección específicos de semillas, podría permitir la subsistencia y reparación de los fotosistemas, y la consecuente supervivencia de la planta. Los programas genéticos denominados como específicos de semillas en plantas normales, permanecen activos en los órganos vegetativos de las plantas de resurrección. Así, la maquinaria fotosintética podría protegerse frente a la deshidratación severa de forma similar a la propuesta por nosotros (Dinakar *et al.*, 2012).

### ***La sobreexpresión ectópica de HaHSFA9 retarda la senescencia vegetativa en las plántulas 35S:A9.***

En nuestro trabajo, hemos demostrado que la sobreexpresión de HaHSFA9 en plántulas de tabaco confiere un retardo de la senescencia en las plántulas 35S:A9 (ver **Figuras r11 y r12**). El



proceso de senescencia, al igual que otros tipos de muertes celulares programadas y la respuesta a estrés abiótico, está asociada con la sobreproducción de ROS, los cuales oxidan proteínas, lípidos y ADN, rompiendo la homeostasis celular y provocando la peroxidación de lípidos, daños celulares, y finalmente la muerte celular (Khann-Chopra *et al.*, 2013). El desmantelamiento de los cloroplastos es una característica típica de la senescencia en hojas (Mulisch & Krupinska, 2013). Las plántulas 35S:A9 muestran un retardo en la pérdida de clorofila durante los ensayos de inducción de la senescencia, uno de los principales síntomas del proceso de senescencia, y que puede interpretarse como un retardo en el desmantelamiento de los cloroplastos en estas líneas. Esta protección de las membranas tilacoidales y de los componentes fotosintético se correlaciona con la protección de la maquinaria fotosintética frente a estrés oxidativo descrita para las plántulas 35S:A9 (ver **Figura r9**). Así, los diferentes mecanismos de estabilización de la maquinaria fotosintética y su protección frente a daños por estrés oxidativo inducidos por el programa genético activado por el factor *HaHSFA9* podrían contribuir al retardo del proceso de senescencia en las plántulas 35S:A9.

***El programa genético activado por HaHSFA9 incluiría la expresión de otros genes distintos a los genes hsp.***

Mediante hibridación sustractiva (SSH) hemos conseguido identificar 89 genes, potencialmente inducidos por la sobreexpresión del factor *HaHSFA9* en las plántulas 35S:A9 (ver **Anexo I**). Gran parte de los productos genéticos de estos genes “candidatos” realizan su función en los cloroplastos o en el núcleo, y están implicados principalmente en rutas energéticas o de transporte de electrones, en la respuesta de la planta a distintas condiciones de estrés o en el metabolismo de proteínas (ver **Figura r26**). Entre los genes clonados por SSH cuya función puede asignarse en base a su secuencia, nos llamó la atención la muy elevada abundancia (35-40 %) de genes implicados en el aparato fotosintético. Esto incluye a varios componentes de los cuatro complejos proteicos que catalizan la transferencia de electrones y la transducción de energía fotosintética (PSII, citocromo *b<sub>6</sub>f*, PSI y ATP sintasa), así como genes implicados en la biogénesis de los cloroplastos. Estos resultados nos llevaron a centrar nuestra atención principalmente en estos genes, comprobando su inducción a nivel de acumulación de ARNm. De los 30 genes seleccionados (ver **Tabla r1**), hemos confirmado por RT-qPCR la inducción de 13 de estos genes en las plántulas 35S:A9, aunque la mayoría de ellos a niveles moderadamente bajos (entre 1,5 y 2,0 veces, ver **Figura r27** y **Tabla r1**). Sin embargo, el empleo de 3 genes internos de referencia y

las repeticiones experimentales realizadas confirman dicha inducción moderada, una inducción que no ocurre por ejemplo con el gen *PsbA* (D1), que está codificado por el genoma cloroplástico y que hemos usado como control negativo. Además, no nos resulta sorprendente la inducción moderada de los genes confirmados por RT-qPCR que están relacionados con el aparato fotosintético, dada la importancia de la regulación traduccional (más que la transcripcional) en la biogénesis de los cloroplastos (Jarvis & López-Juez, 2013). Estos resultados indican que el programa genético activado por *HaHSFA9* incluiría otros genes distintos a *hsp*. Algunos de estos genes están implicados en la biogénesis de los cloroplastos y en la protección y estabilización de los fotosistemas, como discutimos con más detalle a continuación.

Hemos confirmado a nivel de ARN la inducción del gen *shsp-P* en las plántulas 35S:A9, lo cual es consistente con la inducción de la acumulación de proteínas sHSP-P observado en dichas plántulas (ver **Figura r2A**). Estudios recientes demostraron que la proteína plastidial HSP21 de *Arabidopsis* interacciona con la proteína pTAC5 del nucleóide plastidial, y es esencial durante estrés por calor para mantener la actividad transcripcional en el cloroplasto, dependiente de la ARN polimerasa codificada por el genoma plastidial (Zhong *et al.*, 2013). Sin embargo, en nuestro estudio no hemos encontrado evidencias de la inducción en las plántulas 35S:A9 de ninguno de los genes “candidatos” codificados por el genoma plastidial analizados, como las subunidades del PSII: *PsbA* (proteína D1), *PsbH* y *PsbI*; y las subunidades de la ATP sintasa cloroplástica: *AtpG* y *AtpE* (ver **Tabla r1**). No parece por tanto que los efectos complejos que causa la sobreexpresión ectópica de *HaHSFA9* sobre el aparato fotosintético se deban a la inducción de la acumulación de sHSP-P a temperaturas normales del crecimiento.

Entre los componentes del PSII inducidos en las plántulas 35S:A9, encontramos las subunidades *PsbP* y *PsbR* (ver **Figura r27**). Sin embargo, no hemos observado inducción de otros componentes del PSII, como las subunidades D1 (*PsbA*), CP47 (*PsbB*), *PsbO*, *PsbH*, *PsbI* y *PsbX* (ver **Tabla r1**). Las subunidades *PsbP* y *PsbR* son dos proteínas extrínsecas del PSII, componentes estructurales del complejo OEC, junto a las subunidades *PsbO* y *PsbQ* (Allahverdiyeva *et al.*, 2013). La subunidad *PsbR* es necesaria para el ensamblaje estable de la subunidad *PsbP* (Suorsa *et al.*, 2006). Además, la eliminación de *PsbR* conlleva una disminución en la tasa de escisión de oxígeno y en la re-oxidación de la quinona  $Q_A$  (Allahverdiyeva *et al.*, 2007). Asimismo, la subunidad *PsbP* es necesaria para el ensamblaje y estabilización del PSII (Yi *et al.*, 2007, 2009). Por lo que la inducción de ambas subunidades en las plántulas 35S:A9 puede favorecer el ensamblaje y estabilidad del PSII, lo cual es consistente con la mejora de la maquinaria

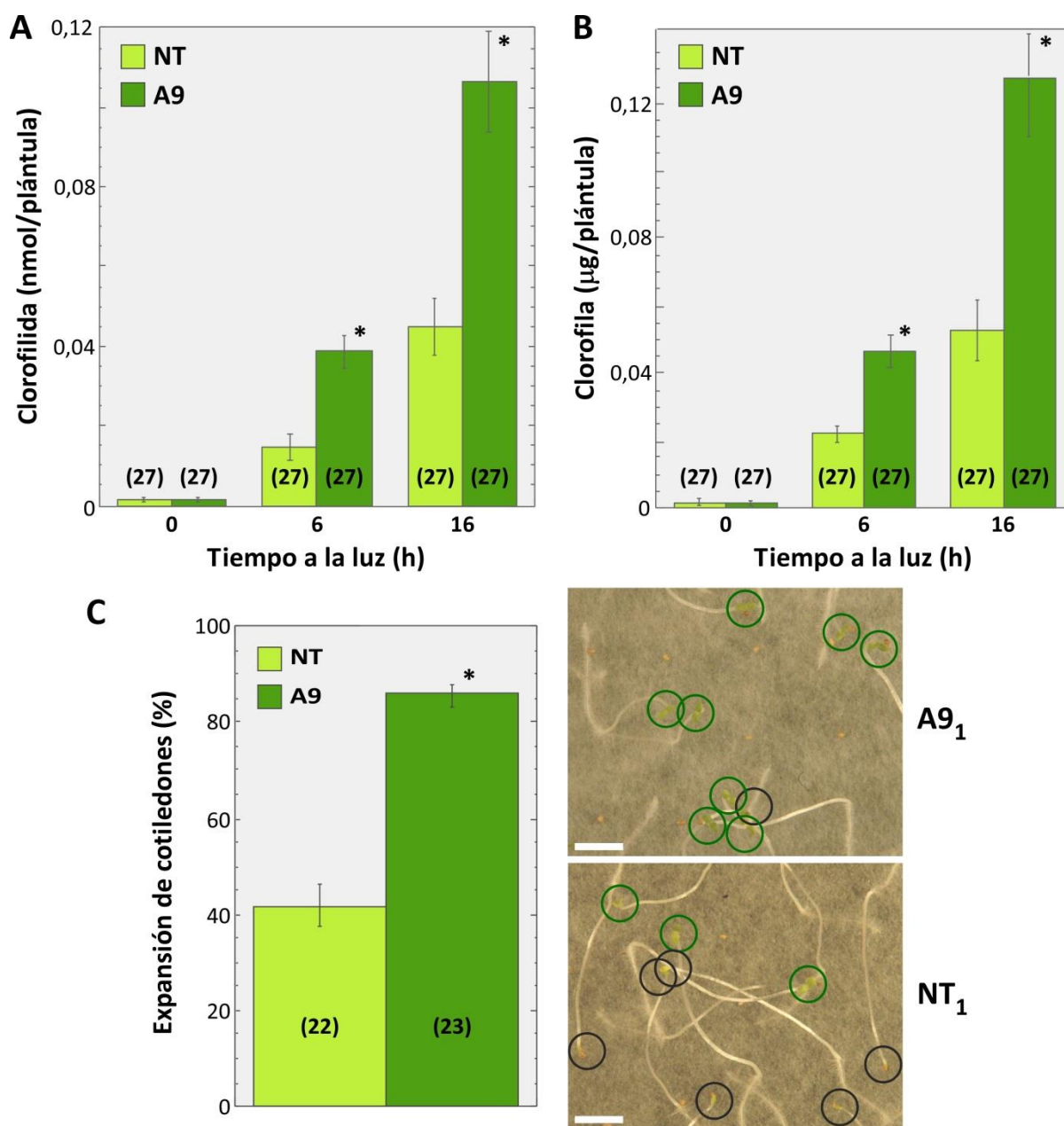
fotosintética observada en estas plántulas en condiciones normales de cultivo (ver **Figura r6**), y podría ayudar a explicar la mayor estabilidad del PSII en las plántulas 35S:A9 frente a tratamientos de estrés severo (ver **Figuras r7 y r9**). La inducción del gen *psbP* en las plántulas 35S:A9 también es consistente con el aumento de la proteína PsbP observado en estas plántulas bajo condiciones normales de cultivo (ver **Figura r6C**). Sin embargo, la falta de inducción en las plántulas 35S:A9 del gen *psbA*, codificante de la proteína D1, contrasta con el aumento en la acumulación de esta proteína observado en condiciones normales de cultivo (ver **Figura r6C**). Estos resultados nos indican que la mayor acumulación de proteína D1 en las plántulas 35S:A9 se debe a un efecto post-transcripcional, probablemente un incremento de la traducción de su ARNm inducido indirectamente por la sobreexpresión ectópica de *HaHSFA9*.

Dentro de los componentes del PSI analizados, hemos confirmado la inducción de las subunidades PsaG, PsaH, PsaN y PsaO (ver **Figura r27**). Sin embargo, no encontramos inducción de Ycf3 (ver **Tabla r1**), una proteína implicada en el ensamblaje del PSI (Naver *et al.*, 2001). La subunidad PsaG permite el anclaje del complejo LHCI al PSI. Las subunidades PsaH y PsaO componen, junto a PsaI, PsaL, el dominio de interacción con el complejo LHCII (Amunts *et al.*, 2007; Amunts & Nelson, 2008; Yadavalli *et al.*, 2011). Aunque la función de PsaN no está clara, se ha propuesto que participa en la unión de la plastocianina al PSI (Amunts *et al.*, 2007; Amunts & Nelson, 2008). Por otro lado, también observamos la inducción del gen que codifica la proteína CP29 (ver **Figura r27**), un componente minoritario de los supercomplejos PSII-LHCII que es esencial para su ensamblaje (Kouřil *et al.*, 2012). Estos resultados sugieren que el programa genético activado por *HaHSFA9* podría incidir sobre la maquinaria fotosintética facilitando la biogénesis de los supercomplejos PS-LHC, además de proteger a dichos supercomplejos frente a estreses muy severos (ver **Figuras r7 y r9**).

Las plántulas 35S:A9 también muestran inducción del gen *por-1* (ver **Figura r27**). La enzima POR-1 (NADPH-protoclorofilida oxidoreductasa 1) participa en la ruta de biosíntesis de clorofila, catalizando la reducción dependiente de luz de la protoclorofilida hasta clorofilida, y es requerida para la formación de los cuerpos prolamelares, en los etioplastos. Puesto que POR-1 cataliza el único paso de la biosíntesis de la clorofila que depende estrictamente de la luz, POR-1 resulta esencial para completar la biogénesis de los tilacoides y del aparato fotosintético tras la germinación de la semilla (Masuda *et al.*, 2002; Sakuraba *et al.*, 2013; Jarvis & López-Juez, 2013). Además, la enzima POR desempeña un papel foto-protector durante la foto-morfogénesis (Buhr *et al.*, 2008). La confirmación de la inducción del gen *por-1* en las plántulas 35S:A9 (ver **Figura**

r27) es consistente con estudios recientes de nuestro laboratorio que han demostrado el efecto foto-morfogénico de la sobreexpresión de *HaHSFA9* en plántulas transgénicas de tabaco (Figura d1; Prieto-Dapena et al., *datos no publicados*). De esta forma, se ha demostrado un incremento en la acumulación de clorofila y clorofila en las plántulas 35S:A9 durante la germinación a la luz (Figura d1A y B), así como una mayor extensión de los cotiledones durante la germinación en oscuridad (Figura d1C). Todos estos resultados demuestran que sobreexpresión la ectópica de *HaHSFA9* en plántulas favorece la foto-morfogénesis, lo que concuerda con los efectos observados sobre la maquinaria fotosintética en las plántulas 35S:A9 bajo condiciones normales de cultivo (ver Figura r6C).

Por otro lado, las plántulas 35S:A9 también muestran inducción a nivel de ARNm de la enzima tiamina sintasa (ver Figura r27). La tiamina o vitamina B<sub>1</sub> es un cofactor esencial, requerido para la actividad de multitud de enzimas de las principales rutas metabólicas, como el ciclo de Krebs, la glicólisis, el ciclo pentosa fosfato o la biosíntesis de pigmentos (Wei et al., 2002; Tunc-Ozdemir et al., 2009). Además, es posible que el metabolismo de la tiamina esté implicado en la protección contra diversos estreses. En plantas, se ha demostrado que la tiamina puede aliviar los efectos de multitud de estreses ambientales. Por ejemplo, la aplicación de tiamina exógena contrarrestó los efectos negativos provocados por el crecimiento bajo alta concentración salina (Sayed & Gadallah, 2002) y confirió resistencia a infecciones fúngicas, bacterianas y virales en arroz, *Arabidopsis* y otras especies vegetales de interés agronómico (Ahn et al., 2005). La tiamina también está implicada en la respuesta a condiciones de estrés como la privación de azúcares e hipoxia en *Arabidopsis* (Ribeiro et al., 2005). En plantas de *Arabidopsis* sometidas a diferentes condiciones de estrés abiótico, aumenta la biosíntesis de tiamina y tiamina pirofosfato (TPP), protegiendo a la célula frente al daño oxidativo (Tunc-Ozdemir et al., 2009). Y en plántulas de maíz, se acumula tiamina libre como respuesta a estrés abiótico (Ribeiro et al., 2005; Rapala-Kozik et al., 2008). Además, el metabolismo de la tiamina se regula a nivel transcripcional durante el desarrollo del embrión. Así, el gen *thic1* se expresa de forma abundante durante el desarrollo del embrión en maíz. El análisis transcripcional indica que las plantas de resurrección emplean estrategias de resistencia a la desecación comúnmente usadas por las semillas ortodoxas y estructuras reproductivas como el polen, entre las que se encuentra la biosíntesis de tiamina (Suarez-Rodriguez et al., 2010). El aumento a nivel de ARNm de tiamina sintasa en las plántulas 35S:A9 puede correlacionarse así con los mecanismos de protección frente a estrés oxidativo y deshidratación severa (ver Figura r27).



**Figura d1. Efecto foto-morfogénico del factor *HaHSFA9*.** Comparación del incremento de pigmentos fotosintéticos entre las plántulas de 3-4 semanas 35S:A9 (A9) y sus hermanas no transgénicas (NT), germinadas y mantenidas en oscuridad durante 10 días (muestras 0 h), y subsecuentemente sometidas a iluminación de cultivo de forma continua durante 6 o 16h. **(A)** Aumento de la cantidad de clorofilida (nmol/plántula), un precursor de la clorofila sintetizado en un paso dependiente de la luz catalizado por la enzima POR-1. **(B)** Aumento de la cantidad total de clorofila (µg/plántula). **(C)** Expansión de los cotiledones (%) tras 16h de luz continua. Se muestran fotografías representativas de la expansión de los cotiledones, correspondientes a una línea 35S:A9 (A9<sub>1</sub>) y su correspondiente hermana NT (NT<sub>1</sub>). Los círculos verdes marcan los cotiledones extendidos y los círculos negros los cotiledones sin extender. Datos correspondientes a 3 experimentos independientes y 2-3 repeticiones por experimento, con 3 líneas homocigóticas independientes 35S:A9 (A9<sub>1</sub>, A9<sub>2</sub> y A9<sub>3</sub>) y sus correspondientes líneas hermanas no transgénicas (NT<sub>1</sub>, NT<sub>2</sub> y NT<sub>3</sub>). Entre paréntesis se indica el número de medidas correspondiente a cada valor medio. El asterisco (\*) indica diferencias estadísticamente significativas: P=0,01. Las barras de escala equivalen a 0,5 cm. Adaptado de Prieto-Dapena *et al.*, datos no publicados.

Los efectos sobre la biogénesis de los cloroplastos y la estabilización de la maquinaria fotosintética permitirían diferenciar a *HaHSFA9* del resto de HSF de plantas analizados funcionalmente hasta el momento presente. Sin embargo, sólo hemos caracterizado 116 de los clones resultantes de la sustracción, con una baja tasa de repetición de genes, y sólo hemos analizado la inducción de 30 de estos genes, confirmando la inducción de 13 de ellos (ver **Figura r27**). Nuestro análisis de los clones SSH es claramente incompleto, ya que entre ellos no hemos encontrado aún muchos de los genes conocidos cuya expresión induce *HaHSFA9* (por ejemplo sHSP-CI, sHSP-CII, HSP101, etc.). Todo esto nos indica que los genes confirmados hasta el momento sólo constituyen una pequeña parte de los genes activados (directa o indirectamente) por *HaHSFA9*. De especial interés, por ejemplo, y en relación con los efectos de *HaHSFA9* sobre el aparato fotosintético pudieran ser los genes clonados relacionados con la traducción de genes plastidiales. Entre estos se incluyen genes cuya mutación resulta letal para la embriogénesis (como el transportador de oligopéptidos OPT3 y la enzima Asp-ARNt sintetasa; ver **Anexo I**), lo que indica su importancia para la biogénesis de los cloroplastos.

### ***El factor HaHSFA4a co-activa junto a HaHSFA9 un programa genético implicado en la tolerancia a estreses abióticos extremos.***

El trabajo previo de nuestro laboratorio indicó la existencia de otros factores HSF de clase A que pudieran participar junto a *HaHSFA9* en la activación del programa genético implicado en la longevidad de semillas y la tolerancia a deshidratación (Tejedor-Cano *et al.*, 2010; Carranco *et al.*, 2010). La interacción física entre *HaHSFA4a* y *HaHSFA9*, y el elevado sinergismo transcripcional mostrado al co-exresar ambos HSF, permitieron proponer a *HaHSFA4a* como uno de los posibles factores HSF implicados en la co-activación del programa genético activado por *HaHSFA9* (Tejedor-Cano *et al.*, 2014).

Este trabajo confirma funcionalmente que al menos dos HSF, *HaHSFA9* y *HaHSFA4a*, co-activan el programa genético implicado en la tolerancia de la plántula a estreses abióticos extremos. Hasta la fecha, la interacción sinérgica entre factores HSF con capacidad activadora de la transcripción en plantas sólo se había analizado mediante expresión transitoria (Chan-Schaminet *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Tejedor-Cano *et al.*, 2014). Además, nuestro trabajo representa, hasta donde conocemos, el primer estudio de los efectos de la sobreexpresión combinada de factores HSF en plantas transgénicas. La sobreexpresión ectópica combinada de

los factores *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* en plántulas transgénicas de tabaco muestra efectos sinérgicos a nivel funcional en la tolerancia a condiciones severas de deshidratación y estrés oxidativo (ver Figuras r23 y r24). Así, la sobreexpresión ectópica combinada de *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* duplica la supervivencia de la plántula completa tras tratamientos extremos de deshidratación y estrés oxidativo, observada previamente al sobreexpresar ectópicamente *HaHSFA9*. La sobreexpresión ectópica conjunta de *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* en plántulas también mejora ligeramente la estabilidad de las membranas celulares (ver Figura r21). Además, las plántulas que sobreexpresan conjuntamente *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* también muestran una mayor regeneración (pero no una mayor protección) tras tratamientos de inducción de la senescencia (ver Figura r25). Esto último indica que *HaHSFA4a* potenciaría alguno de los efectos sobre la biogénesis de los cloroplastos de *HaHSFA9*. Todos los efectos de la sobreexpresión ectópica conjunta de *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* se correlacionan con un ligero incremento de la acumulación, a temperaturas normales de crecimiento, de determinadas isoformas de proteínas sHSP-CI y sHSP-CII en las plántulas 35S:A9/A4a, entre las que se incluyen polipéptidos HSP específicos de semillas (ver Figura r19A y B). Esto último vuelve a indicarnos que los efectos observados se deben no sólo a dichas proteínas, sino a su combinación con las codificadas por otros genes (no *hsp*) inducidos por *HaHSFA9*.

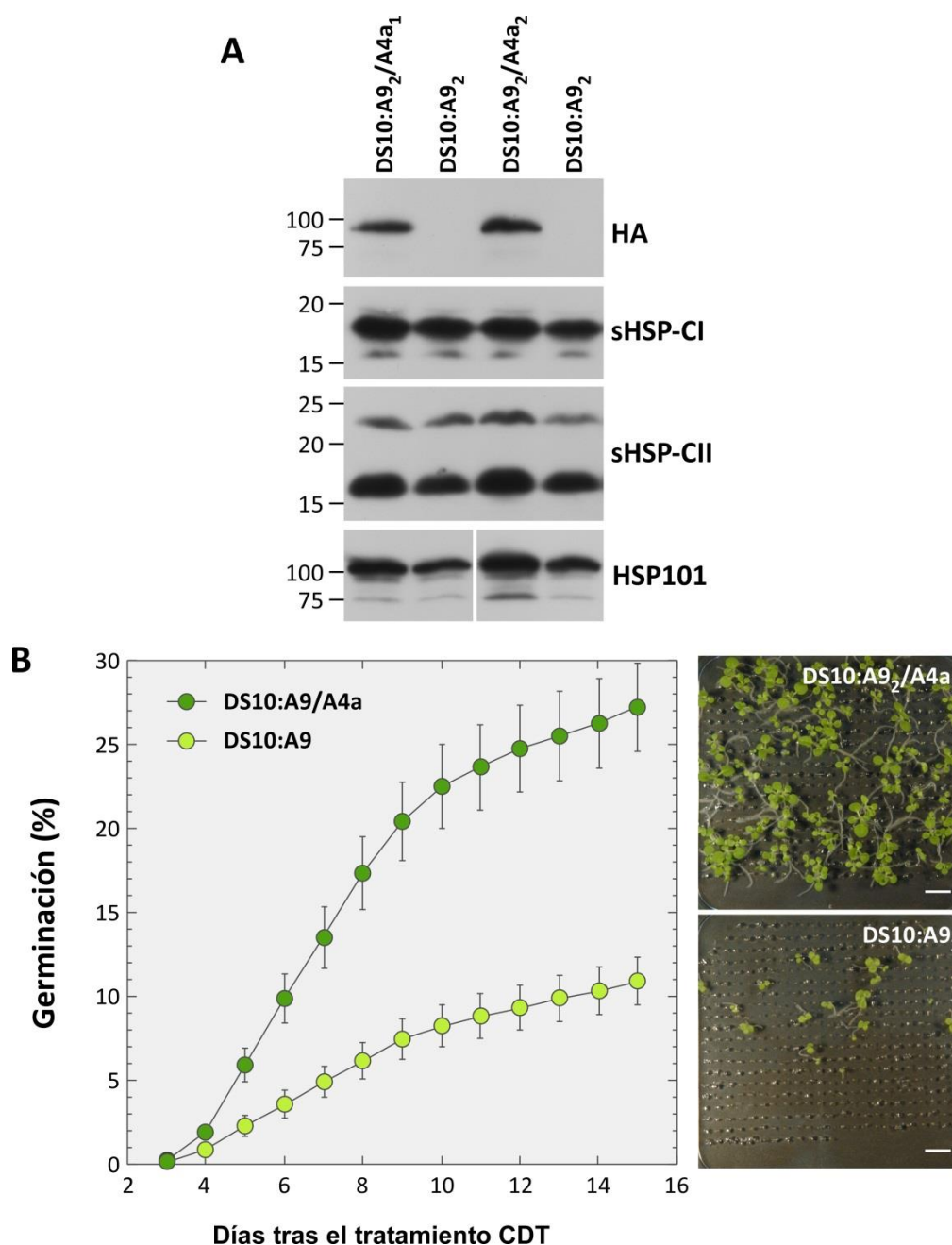
A parte de nuestro trabajo, hasta el momento, sólo existe un único estudio que describa el efecto de la sobreexpresión de los factores de la familia HSFA4, correspondientes a los factores HSFA4 de trigo (*TaHSFA4a*) y arroz (*OsHSFA4a* y *OsHSFA4d*) (Shim *et al.*, 2009). La sobreexpresión de *TaHSFA4a* en plantas de arroz confiere tolerancia a cadmio. Sin embargo, *TaHSFA4a* no parece estar implicado en la termotolerancia (Shim *et al.*, 2009). Además, *TaHSFA4a* y *OsHSFA4a*, confieren tolerancia a Cd en levaduras, mientras que *OsHSFA4d* no confiere dicha tolerancia (Shim *et al.*, 2009). Por otro lado, el análisis mediante pérdida de función de los factores *AtHSFA4c* y *OsHSFA4d*, correspondientes respectivamente a *Arabidopsis* y arroz, ha mostrado funciones adicionales de los factores HSFA4. Estas funciones incluyen la detección de estrés oxidativo moderado y el gravitropismo, ambas funciones alejadas de la respuesta a choque térmico convencional y la termotolerancia (Yamanouchi *et al.*, 2002; Davletova *et al.*, 2005; Fortunati *et al.*, 2008). Nuestro estudio del factor *HaHSFA4a* incluye la primera descripción de los efectos de la sobreexpresión de un factor HSFA4 de dicotiledóneas. El factor *HaHSFA4a*, al igual que *TaHSFA4a* (Shim *et al.*, 2009), no parece estar implicado en la respuesta canónica a choque térmico ni en la termotolerancia (ver Figuras r13 y r14). Sin



embargo, los efectos funcionales de *HaHSFA4a* parecen ser distintos a los conocidos para otros HSFA4 similares. La falta de efecto de *HaHSFA4a*, sobre la acumulación de proteínas HSP y sobre la termotolerancia, contrasta con lo observado al sobreexpresar individualmente otros factores HSF de clase A, entre los que se incluyen, por ejemplo, los factores HSFA1b, HSFA2, HSFA3 y HSFA9 de *Arabidopsis*, así como de otras plantas (Prändl *et al.*, 1998; Mishra *et al.*, 2002; Nishizawa *et al.*, 2006; Ogawa *et al.*, 2007; Prieto-Dapena *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2008; Banti *et al.*, 2010; Xin *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013). La mejora de los fenotipos de tolerancia frente a deshidratación y estrés oxidativo severos mediada por *HaHSFA4a* es estrictamente dependiente de su sobreexpresión junto a *HaHSFA9* (comparar Figuras r15 y r16 con las Figuras r23 y r24).

Debido al fenotipo normal de las plántulas 35S:A4a (ver Figuras r15 y r16), la mejora de los fenotipos en las plántulas 35S:A9/A4a puede explicarse como una mejora sinérgica de los efectos de *HaHSFA9*. El factor *HaHSFA4a* podría estar especialmente implicado en funciones específicas de semillas relacionadas con la longevidad y la tolerancia a deshidratación severa. Otros estudios de nuestro laboratorio no incluidos en esta memoria han demostrado que el factor *HaHSFA4a* también mejora la longevidad de semillas cuando se sobreexpresa junto a *HaHSFA9* (Figura d2, Personat *et al.*, 2014). Igualmente, en semillas de tabaco, donde se expresa el factor HSFA9 endógeno, la sobreexpresión individual de *HaHSFA4a* también mejora la longevidad de semillas (Personat *et al.*, 2014). En ambos casos se observaron también ligeros aumentos sobre la acumulación de determinadas proteínas HSP a temperaturas normales de crecimiento. Sin embargo, la sobreexpresión única de *HaHSFA4a* en plántulas, donde no se expresa el factor HSFA9 endógeno, no mejora la termotolerancia (ver Figura r14), ni induce la acumulación de proteínas HSP como HSP101, sHSP-CI, sHSP-CII y sHSP-P, en condiciones normales de cultivo (ver Figura r13). Estos resultados indican que el factor *HaHSFA4a* no es capaz de interaccionar con los HSF de tabaco implicados en la termotolerancia vegetativa (basal o adquirida), que incluyen tanto a los HSF expresados de forma constitutiva en plántulas, como a los HSF inducidos por los tratamientos de aclimatación al calor usados en nuestro estudio. Por lo que los efectos funcionales del factor *HaHSFA4a* parecen requerir al menos la presencia de *HaHSFA9* y/o otros HSF específicos de semillas que no están presentes en órganos vegetativos, tanto bajo condiciones normales de cultivo como durante aclimatación al calor. Este requerimiento funcional podría diferenciar al factor *HaHSFA4a* del resto de los factores HSF de clase A vegetales, los cuales han sido descritos hasta el momento como factores con capacidad de activación transcripcional "intrínseca" (independiente de otro HSF).





**Figura d2.** Efectos de la sobreexpresión conjunta de *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* en semillas transgénicas de tabaco. **(A)** Efecto sobre la acumulación de proteínas HSP en plántulas 35S:A9/A4a. Detección de la acumulación de proteínas de choque térmico, mediante *western blot* en electroforesis desnaturizante SDS-PAGE en semillas dobles transgénicas DS10:A9/A4a y sus hermanas transgénicas simples DS10:A9. Se usaron anticuerpos específicos frente a las proteínas: HA, *tag* de hemaglutinina unida a *HaHSFA4a*; HSP101; sHSP-CI, y sHSP-CII. Se muestran resultados representativos de 2 líneas dobles transgénicas homocigóticas independientes 35S:A9/A4a y sus correspondientes líneas hermanas transgénicas simples 35S:A9. A la izquierda, se indican los marcadores de peso molecular (kDa). A la derecha se indica el anticuerpo específico usado para la detección de cada proteína. **(B)** Efectos sobre la resistencia a tratamientos de deterioro controlado CDT (envejecimiento artificial). Porcentaje de germinación a varios tiempos tras el tratamiento CDT, observado con semillas de 7 líneas dobles transgénicas DS10:A9/A4a y sus líneas hermanas transgénicas simples DS10:A9. A la derecha se muestran fotografías representativas de la germinación después de 15 días tras el tratamiento CDT de una línea DS10:A9/A4a y su correspondiente hermana DS10:A9. (Adaptado de Personat *et al.*, 2014)

Aunque estos resultados confirman que *HaHSFA9* y *HaHSFA4a* co-activan el mismo programa genético implicado en la longevidad de semillas y tolerancia a desecación en girasol, no podemos excluir que otros HSF puedan participar en el mismo programa genético junto a *HSFA9* y *HSFA4a*. Nuestros resultados indican que si existieran otros HSF adicionales capaces de interactuar funcionalmente con el factor *HaHSFA4a* en tabaco, estos HSF (al igual que *HSFA9*) deberían expresarse preferencial o exclusivamente en semillas.

## Conclusiones



1. El programa genético activado semillas de girasol por el factor *HaHSFA9* incluye la expresión de proteínas sHSP-P.
2. La sobreexpresión ectópica del factor *HaHSFA9* en plántulas de tabaco protege la maquinaria fotosintética frente al daño producido por estreses abióticos extremos, como deshidratación severa o drásticas condiciones de estrés oxidativo.
3. La sobreexpresión ectópica del factor *HaHSFA9* en plántulas de tabaco retrasa la senescencia vegetativa inducida por distintas condiciones de estrés.
4. El factor *HaHSFA4a* potencia todos los efectos fenotípicos observados para la sobreexpresión de *HaHSFA9* en plántulas de tabaco. Esto es estrictamente dependiente de *HaHSFA9*.
5. Nuestros resultados confirman la implicación del factor *HaHSFA4a* en la co-activación transcripcional del programa regulado por *HaHSFA9*.
6. El factor *HaHSFA9* induce moderadamente la expresión de un conjunto muy peculiar de genes distintos a los genes *hsp*. Entre dichos genes destaca la abundancia inusual de los relacionados funcionalmente con el aparato fotosintético.
7. Entre los genes, directamente o indirectamente, inducidos por *HaHSFA9* se incluyen genes implicados en la biogénesis de la maquinaria fotosintética. Esto nos ha permitido predecir que *HaHSFA9* produce un efecto foto-morfogénico que ha sido confirmado posteriormente a nuestro trabajo.



## Bibliografía





- Adamska I. and Klopstech K.** (1991) Evidence for the localization of the nuclear-coded 22-kDa heat-shock protein in a subfraction of thylakoid membranes. *Eur. J. Biochem.*, **198**, 375-381.
- Ahn I.P., Kim S. and Lee Y.H.** (2005) Vitamin B1 functions as an activator of plant disease resistance. *Plant Physiol.*, **138**, 1505-1515.
- Alam M.M., Sharmin S., Nabi Z., Mondal S.I., Islam M.S. Nayeem S.B., Shoyaib M. and Khan H.** (2010) A putative leucine-rich repeat receptor-like kinase of jute involved in stress response. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **28**, 394-402.
- Allahverdiyeva Y., Mamedov F., Suorsa M., Styring S., Vass I. and Aro E.M.** (2007) Insights into the function of PsbR protein in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 677-685.
- Allakhverdiev S.I., Kreslavski V.D., Klimov V.V., Los D.A., Carpentier R. and Mohanty P.** (2008) Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynth. Res.*, **98**, 541-550.
- Allahverdiyeva Y., Suorsa M., Rossi F., Pavesi A., Kater M.M., Antonacci A., Tadini L., Pribil M., Schneider A., Wanner G., Leister D., Aro E.M., Barbato R. and Pesaresi P.** (2013) Arabidopsis plants lacking PsbQ and PsbR subunits of the oxygen-evolving complex show altered PSII super-complex organization and short-term adaptive mechanisms. *The Plant Journal*, **75**, 671-684.
- Almeida T., Menéndez E., Capote T., Ribeiro T., Santos C. and Gonçalves S.** (2013a) Molecular characterization of *Quercus suber* MYB1, a transcription factor up-regulated in cork tissues. *J. Plant Physiology*, **170**, 172-178.
- Almeida T., Pinto G., Correia B., Santos C. and Gonçalves S.** (2013b) *QsMYB1* expression is modulated in response to heat and drought stresses and during plant recovery in *Quercus suber*. *Plant Physiology and Biochemistry*, **73**, 274-281.
- Almoguera C. and Jordano J.** (1992) Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low-molecular-weight heat-shock protein and Lea mRNAs. *Plant Molecular Biology*, **19**, 781-792.
- Almoguera C., Prieto-Dapena P. and Jordano J.** (1998) Dual regulation of a heat shock promoter during embryogenesis: stage-dependent role of heat shock elements. *Plant J.*, **13**, 437-46.

**Almoguera C., Rojas A., Díaz-Martín J., Prieto-Dapena P., Carranco R. and Jordano J.** (2002) A seed-specific heat-shock transcription factor involved in developmental regulation during embryogenesis in sunflower. *J. Biol. Chem.*, **277**, 43866-43872.

**Almoguera C., Prieto-Dapena P., Personat J.M., Tejedor-Cano J., Lindahl M., Diaz-Espejo A. and Jordano J.** (2012) Protection of the photosynthetic apparatus from extreme dehydration and oxidative stress in seedlings of transgenic tobacco. *PLoS One*, **7**, e51443.

**Amano M., Iida S. and Kosuge K.** (2012) Comparative studies of thermotolerance: different modes of heat acclimation between tolerant and intolerant aquatic plants of the genus *Potamogeton*. *Annals of Botany*, **109**, 443–452.

**Amunts A., Drory O. and Nelson N.** (2007) The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution. *Nature*, **447**, 58-63.

**Amunts A., Drory O. and Nelson N.** (2008) A Glimpse into the Atomic Structure of Plant Photosystem I. In *Photosynthetic Protein Complexes*. (Fromme P., ed.). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, pp. 65-82.

**Amunts A. and Nelson N.** (2008) Functional organization of a plant Photosystem I: Evolution of a highly efficient photochemical machine. *Plant Physiology and Biochemistry*, **46**, 228-237.

**Amunts A. and Nelson N.** (2009) Plant Photosystem I Design in the Light of Evolution. *Structure*, **17**, 637-650.

**Armbruster U., Zuhlke J., Rengstl B., Kreller R., Makarenko E., Ruhle T., Schunemann D., Jahns P., Weisshaar B., Nickelsen J. and Leister, D** (2010) The Arabidopsis thylakoid protein PAM68 is required for efficient D1 biogenesis and photosystem II assembly. *Plant Cell*, **22**, 3439-3460.

**Aro E.M., Virgin I. and Andersson B.** (1993) Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta*, **1143**, 113-34.

**Aro E.M., Suorsa M., Rokka A., Allahverdiyeva Y., Paakkarinen V., Saleem A., Battchikova N. and Rintamaki E.** (2005) Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *J. Exp. Bot.*, **56**, 347-356.

**Baker N.R.** (2008) Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis *in vivo*. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **29**, 89-113.

- Baldwin A.J., Lioe H., Robinson C.V., Kay L.E. and Benesch J.L.** (2011)  $\alpha$ B-crystallin polydispersity is a consequence of unbiased quaternary dynamics. *Journal of Molecular Biology*, **413**, 297–309.
- Baniwal S.K., Bharti K., Chan K.Y., Fauth M., Ganguli A., Kotak S., Mishra S.K., Nover L., Port M., Scharf K.D., Tripp J., Weber C., Zielinski D. and von Koskull-Döring P.** (2004) Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J. Biosci.*, **29**, 471-887.
- Banti V., Mafessoni F., Loreti E., Alpi A. and Perata P.** (2010) The heat-inducible transcription factor HsfA2 enhances anoxia tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **152**, 1471–1483.
- Barber J.** (1987) *Trends Biochem. Sci.*, **12**, 321–326.
- Barber J.** (2006) Photosystem II: an enzyme of global significance. *Biochemical Society Transactions*, **34**, 619-630.
- Bartels D. and Sunkar R.** (2005) Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, **24**, 23-58.
- Barua D., Downs C.A., and Heckathorn S.A.** (2003) Variation in chloroplast small heat-shock protein function is a major determinant of variation in thermotolerance of photosynthetic electron transport among ecotypes of *Chenopodium album*. *Functional Plant Biology*, **30**, 1071-1079.
- Basha E., Jones C., Wysocki V., and Vierling E.** (2010) Mechanistic differences between two conserved classes of small heat shock proteins found in the plant cytosol. *J. Biol. Chem.*, **285**, 11489-11497.
- Basha E., O'Neill H., Vierling E.** (2012) Small heat shock proteins and alpha-crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends in Biochemical Science*, **37**, 106–117.
- Becker D.** (1990) Binary vectors which allow the exchange of plant selectable markers and reporter genes. *Nucleic Acids Res*, **18**, 203.
- Beckett R.P.** (2001) ABA-induced tolerance to ion leakage during rehydration following desiccation in the moss *Atrichum androgynum*. *Plant Growth Regulation*, **35**, 131-135.
- Benedito V.A., Torres-Jerez I., Murray J.D., Andrianakaja A., Allen S., Kakar K., Wandrey M., Verdier J., Zuber H., Ott T., Moreau S., Niebel A., Frickey T., Weiller G., He J., Dai X., Zhao P. X.,**

**Tang Y. and Udvardi M.K.** (2008) A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, **55**, 504-513.

**Bharti K., Schmidt E., Lyck R., Heerklotz D., Bublak D. and Scharf K.D.** (2000) Isolation and characterization of HsfA3, a new heat stress transcription factor of *Lycopersicon peruvianum*. *Plant J.*, **22**, 355–365.

**Bharti K., von Koskull-Doring P., Bharti S., Kumar P., Tintschl-Korbitzer A., Treuter E. and Nover L.** (2004) Tomato heat stress transcription factor HsfB1 represents a novel type of general transcription coactivator with a histone-like motif interacting with the plant CREB binding protein ortholog HAC1. *Plant Cell*, **16**, 1521–1535.

**Black M. and Pritchard H.W.** (eds.) (2002) *Desiccation and survival in plants. Drying without dying*. UK: CABI Publishing.

**Bölter B., Sharma R. and Soll J.** (2007) Localisation of Arabidopsis NDPK2—revisited. *Planta*, **226**, 1059–1065.

**Bondino H.G., Valle E.M. and Ten Have A.** (2012) Evolution and functional diversification of the small heat shock protein/alpha-crystallin family in higher plants. *Planta*, **235**, 1299–1313.

**Boscheinen O., Lyck R., Queitsch C., Treuter E., Zimarino V. and Scharf K.D.** (1997) Heat stress transcription factors from tomato can functionally replace HSF1 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **255**, 322–331.

**Boston R.S., Viitanen P.V. and Vierling E.** (1996) Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol. Biol.*, **32**, 191–222.

**Buhr F., Bakkour M.E., Valdez O., Pollmann S., Lebedev N., Reinbothe S. and Reinbothe C.** (2008) Photoprotective role of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase A. *PNAS*, **105**, 12629–12634.

**Bukau B., Weissman J. and Horwich A.** (2006) Molecular chaperones and protein quality control. *Cell*, **125**, 443–451.

**Bullock W.O., Fernández J.M., and Short J.M.** (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with b-galactosidase selection. *Biotech*, **5**, 376-379.

- Calderon R.H., García-Cerdán J.G., Malnoë A., Cook R., Russell J.J., Gaw C., Dent R.M., de Vitry C. and Niyogi K.K.** (2013) A conserved rubredoxin is necessary for Photosystem II accumulation in diverse oxygenic photoautotrophs. *J. Biol. Chem.*, **288**, 26688–26696.
- Carranco R., Almoguera C. and Jordano J.** (1997) A plant small heat shock protein gene expressed during zygotic embryogenesis but noninducible by heat stress. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 27470–27475.
- Carranco R., Espinosa J.M., Prieto-Dapena P., Almoguera C. and Jordano J.** (2010) Repression by an auxin/indole acetic acid protein connects auxin signaling with heat shock factor-mediated seed longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 21908–21913.
- Carretero-Paulet L., Galstyan A., Roig-Villanova I., Martínez-García J.F., Bilbao-Castro J.R. and Robertson D.L.** (2010) Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in Arabidopsis, poplar, pice, moss, and algae. *Plant Physiology*, **153**, 1398–1412.
- Carrión C.A., Costa M.L., Martínez D.E., Mohr C., Humbeck K. and Guamet J.J.** (2013) *In vivo* inhibition of cysteine proteases provides evidence for the involvement of 'senescence-associated vacuoles' in chloroplast protein degradation during dark-induced senescence of tobacco leaves. *J. Exp. Bot.*, **64**, 4967–4980.
- Chan-Schaminit K.Y., Baniwal S.K., Bublak D., Nover L. and Scharf K.D.** (2009) Specific interaction between tomato HsfA1 and HsfA2 creates hetero-oligomeric superactivator complexes for synergistic activation of heat stress gene expression, *J. Biol. Chem.*, **284**, 20848–20857.
- Charng Y.Y., Liu H.C., Liu N.Y., Chi W.T., Wang C.N., Chang S.H. and Wang T.T.** (2007) A heatinducible transcription factor, HsfA2, is required for extension of acquired thermotolerance in Arabidopsis *Plant Physiol.*, **143**, 251–262.
- Chatelain E., Hundertmark M., Leprince O., Gall S.L., Satour P., Deligny-Penninck S., Rogniaux H. and Buitink J.** (2012) Temporal profiling of the heat-stable proteome during late maturation of *Medicago truncatula* seeds identifies a restricted subset of late embryogenesis abundant proteins associated with longevity. *Plant, Cell and Environment*, **35**, 1440–1455.

**Chatelain E., Satour P., Laugier E., Ly Vu B., Payet N., Rey P. and Montrichard F.** (2013) Evidence for participation of the methionine sulfoxide reductase repair system in plant seed longevity. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **110**, 3633-3638.

**Chaturvedi A.K., Mishra A., Tiwari V. and Jha B.** (2012) Cloning and transcript analysis of type 2 metallothionein gene (SbMT-2) from extreme halophyte *Salicornia brachiata* and its heterologous expression in *E. coli*. *Gene*, **499**, 280–287.

**Chauhan H., Khurana N., Nijhavan A., Khurana J.P. and Khurana P.** (2012) The wheat chloroplastic small heat shock protein (sHSP26) is involved in seed maturation and germination and imparts tolerance to heat stress. *Plant, Cell and Environment*, **35**, 1912–1931.

**Chen H. and Xiong L.** (2009) Enhancement of vitamin B<sub>6</sub> levels in seeds through metabolic engineering. *Plant Biotechnology Journal*, **7**, 673–681.

**Chen H., Chu P., Zhou Y., Li Y., Liu J., Ding Y., Tsang E.W., Jiang L., Wu K. and Huang S.** (2012) Overexpression of *AtOGG1*, a DNA glycosylase/AP lyase, enhances seed longevity and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.*, **63**, 4107-4121.

**Chen Y.E., Zhao Z.Y., Zhang H.Y., Zeng X.Y. and Yuan S.** (2013) The significance of CP29 reversible phosphorylation in thylakoids of higher plants under environmental stresses. *Journal of Experimental Botany*, **64**, 1167–1178.

**Cherry J.H.** (ed.) (1994) Biochemical and cellular mechanisms of stress tolerance in plants. NATO ASI Series H 86.

**Chi Y.H., Moon J.C., Park J.H., Kim H.S., Zulfugarov I.S., Fanata W.I., Jang H.H., Lee J.R., Lee Y.M., Kim S.T., Chung Y.Y., Lim C.O., Kim J.Y., Yun D.J., Lee C.H., Lee K.O. and Lee S.Y.** (2008) Abnormal chloroplast development and growth inhibition in rice thioredoxin m Knock-Down plants. *Plant Physiology*, **148**, 808–817.

**Chitnis P.R., Purvis D. and Nelson N.** (1991) Molecular cloning and targeted mutagenesis of the gene *psaF* encoding subunit III of photosystem I from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.*, **266**, 20146–20151.

**Cline K. and Mori H.** (2001) Thylakoid DeltapH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J. Cell Biol.*, **154**, 719–729.

- Cushman J.C. and Oliver M.J.** (2011) Understanding vegetative desiccation tolerance using integrated functional genomics approaches within a comparative evolutionary framework. In *Plant Desiccation Tolerance*. (Lüttge U., Beck E. and Bartels D., eds.). Heidelberg-Dordrecht-London-New York: Springer, pp. 307-338.
- Davletova S., Rizhsky L., Liang H., Shengqiang Z., Oliver D.J., Coutu J., Shulaev V., Schlauch K. and Mittler R.** (2005) Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **17**, 268–281.
- Dekker J.P. and Boekema E.J.** (2008) Supercomplexes of Photosystems I and II with External Antenna Complexes in Cyanobacteria and Plants. In *Photosynthetic Protein Complexes*. (Fromme P., ed.). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, pp. 137-154.
- Deng X., Hu Z.A., Wang H.X., Wen X.G. and Kuang T.Y.** (2003) A comparison of photosynthetic apparatus of the detached leaves of the resurrection plant *Boea hygrometrica* with its non-tolerant relative *Chirita heterotrichia* in response to dehydration and rehydration. *Plant Sci.*, **165**, 851-861.
- DeRocher A.E. and Vierling E.** (1994) Developmental control of small heat shock protein expression during pea seed maturation. *The Plant Journal*, **5**, 93–102.
- Dinakar C., Djilianov D. and Bartels D.** (2012) Photosynthesis in desiccation tolerant plants: Energy metabolism and antioxidative stress defense. *Plant Sci.*, **182**, 29-41.
- Downs C.A. and Heckathorn S.A.** (1998) The mitochondrial small heat-shock protein protects NADH:ubiquinone oxidoreductase of the electron transport chain during heat stress in plants. *FEBS Lett.*, **430**, 246–250.
- Eisenberg-Domovich Y., Kloppsteck K. and Ohad I.** (1994) Reversible membrane association of heat-shock protein 22 in *Chlamydomonas reinhardtii* during heat shock and recovery. *Eur. J. Biochem.*, **222**, 1041–1046.
- Farrant J., Brandt W. and Lidsey G.G.** (2007) An overview of mechanisms of desiccation tolerance in selected angiosperm resurrection plants. *Plant Stress*, **1**, 72–84.
- Farrant J.M. and Moore J.P.** (2011) Programming desiccation-tolerance: from plants to seeds to resurrection plants. *Curr. Op. in Plant Biol.*, **14**, 340-345.

- Fromme P. and Grotjohann I.** (2008) Overview of photosynthesis. In *Photosynthetic Protein Complexes* (Fromme P., ed.). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, pp1-22.
- García-Cerdán J.G., Sveshnikov D., Dewez D., Jansson S., Funk C. and Schröder W.P.** (2009) Antisense inhibition of the PsbX protein affects PSII integrity in the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, **50**, 191-202.
- García-Cerdán J.G., Kovács L., Tóth T., Kereiche S., Aseeva E., Boekema E.J., Mamedov F., Funk C. and Schröder W.P.** (2011) The PsbW protein stabilizes the supramolecular organization of photosystem II in higher plants. *Plant J.*, **65**, 368-381.
- Gechev T.S., Dinakar C., Benina M., Toneva V. and Bartels D.** (2012) Molecular mechanisms of desiccation tolerance in resurrection plants. *Cell Mol. Life Sci.*, **69**, 3175-3186.
- Georgieva K., Röding, A. and Büchel C.** (2009) Changes in some thylakoid membrane proteins and pigments upon desiccation of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. *J. Plant Physiol.*, **166**, 1520-1528.
- Giese K.C., Basha E., Catague B.Y. and Vierling E.** (2005) Evidence for an essential function of the N terminus of a small heat shock protein *in vivo*, independent of *in vitro* chaperone activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **102**, 18896–18901.
- Guo Y.L., Guettouche T., Fenna M., Boellmann F., Pratt W.B., Toft D.O., Smith D.F. and Voellmy R.** (2001) Evidence for a mechanism of repression of heat shock factor 1 transcriptional activity by a multichaperone complex. *J. Biol. Chem.*, **276**, 45791–45799.
- Guo S.J., Zhou H.Y., Zhang X.S., Li X.G. and Meng Q.W.** (2007) Overexpression of *CaHSP26* in transgenic tobacco alleviates photoinhibition of PSII and PSI during chilling stress under low irradiance. *Journal of Plant Physiology*, **164**, 126-136.
- Hahn A., Bublak D., Schleiff E. and Scharf K.D.** (2011) Crosstalk between Hsp90 and Hsp70 Chaperones and Heat Stress Transcription Factors in Tomato. *The Plant Cell*, **23**, 741–755.
- Härndahl U., Hall R.B., Osteryoung K.W., Vierling E., Bornman J.F. and Sundby C.** (1999) The chloroplast small heat shock protein undergoes oxidation-dependent conformational changes and may protect plants from oxidative stress. *Cell Stress & Chaperones*, **4**, 129-138.



- Haslbeck M., Franzmann T., Weinfurtner D. and Buchner J.** (2005) Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nature Structural and Molecular Biology*, **12**, 842–846.
- Heckathorn S.A., Downs C.A., Sharkey T.D. and Coleman J. S.** (1998) The small, methionine-rich chloroplast heat-shock protein protects photosystem II electron transport during heat stress. *Plant Physiol.*, **116**, 439–444.
- Heckathorn S.A., Ryan S.L., Baylis J.A., Wang D., Hamilton III E.W., Cundiff L. and Luthe D.S.** (2002) *In vivo* evidence from an *Agrostis stolonifera* selection genotype that chloroplast small heat-shock proteins can protect photosystem II during heat stress. *Funct. Plant Biol.*, **29**, 933–944.
- Hilton G.R., Lioe H., Stengel F., Baldwin A.J. and Benesch J.L.P.** (2013) Small heat-shock proteins: paramedics of the cell. *Topics in Current Chemistry*, **328**, 69–98.
- Hoekema A., Hirsch P.R., Hooykaas P.J.J., and Schilperoot R.A. (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, **303**, 179.
- Hoekstra F.A., Golovina E.A. and Buitink J.** (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *TRENDS in Plant Science*, **6**, 431–438.
- Holsters M., Waele D.D., Depicker A., Messens E., Montagu M.V. and Schell J.** (1978) Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.*, **163**, 181–187.
- Horsch R.B., Fry J.E., Hoffmann N.L. Eichholtz D., Rogers S.G. and Fraley R.T.** (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, **227**, 1229–1231.
- Illing N., Denby K.J., Collett H., Shen A. and Farrant J.M.** (2005) The signature of seeds in resurrection plants: A molecular and physiological comparison of desiccation tolerance in seeds and vegetative tissues. *Integr Comp Biol.*, 2005, **45**, 771–787.
- Inoue H., Nojima H. and Okayama H.** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23–28.
- Jarvis P. and López-Juez E.** (2013) Biogenesis and homeostasis of chloroplasts and other plastids. *Molecular cell biology*, **14**, 787–802.

**Jelakovic S., Kopriva S, Süß K.H. and Schulz G.E.** (2003) Structure and catalytic mechanism of the cytosolic D-ribulose-5-phosphate 3-epimerase from rice. *J. Mol. Biol.*, **326**, 127–135.

**Jensen P.E., Haldrup A., Rosgaard L. and Scheller H.V.** (2003) Molecular dissection of photosystem I in higher plants: topology, structure and function, *Physiol. Plant*, **119**, 313–321.

**Jensen P.E., Bassi R., Boekema E.J., Dekker J.P., Jansson S., Leister D., Robinson C., and Scheller H.V.** (2007) Structure, function and regulation of plant photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 335–352.

**Kaul T., Reddy P.S., Mahanty S., Thirulogachandar V., Reddy R.A., Kumar B., Sopory S.K. and Reddy M.K.** (2011) Biochemical and molecular characterization of stress-induced  $\beta$ -carbonic anhydrase from a C<sub>4</sub> plant, *Pennisetum glaucum*. *J. Plant Physiology*, **168**, 601–610.

**Khanna-Chopra R., Nutan K.K. and Pareek A.** (2013) Regulation of Leaf Senescence: Role of Reactive Oxygen Species. In *Plastid Development in Leaves During Growth and Senescence*. (Biswal B., Krupinska K. and Biswal U.C., eds.). Heidelberg-Dordrecht-London-New York: Springer, pp. 393–416.

**Kilian J., Whitehead D., Horak J., Wanke D., Weinl S., Batistic O., D'Angelo C., Bornberg-Bauer E., Kudla J. and Harter K.** (2007) The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses, *Plant J.*, **50**, 347–363.

**Kim K.K., Kim R. and Kim S.H.** (1998) Crystal structure of a small heat shock protein. *Nature*, **394**, 595–599.

**Kim B.H and Schöffl F.** (2002) Interaction between Arabidopsis heat shock transcription factor 1 and 70 kDa heat shock proteins. *J. Exp. Bot.*, **53**, 371–375.

**Kim Y.K., Lee J.Y., Cho H.S., Lee S.S., Ha H.J., Kim S., Cho D. and Pai H.S.** (2005) Inactivation of organellar glutamyl- and seryl-tRNA synthetases leads to developmental arrest of chloroplasts and mitochondria in higher plants. *J. Biol. Chem.*, **280**, 37098–37106.

**Kitagawa M., Matsumara Y. and Tsuchido T.** (2000) Small heat shock proteins, IbpA and IbpB, are involved in resistances to heat and superoxide stresses in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **184**, 165–171.

- Kouřil R., Dekker J.P. and Boekema E.J.** (2012) Supramolecular organization of photosystem II in green plants. *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 2-12.
- Kotak S., Port M., Ganguli A., Bicker F. and von Koskull-Döring P.** (2004) Characterization of C-terminal domains of Arabidopsis heat stress transcription factors (Hsfs) and identification of a new signature combination of plant class A Hsfs with AHA and NES motifs essential for activator function and intracellular localization, *Plant J.*, **39**, 98–112.
- Kotak S., Vierling E., Baumlein H. and von Koskull-Döring P.** (2007a) A novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress proteins during seed development of Arabidopsis. *The Plant Cell*, **19**, 182–195.
- Kotak S., Larkindale J., Lee U., Döring P., Vierling, E. and Scharf K.D.** (2007b) Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, **10**, 310-316.
- Krauss N.** (2008) Structure and Function of Cyanobacterial Photosystem I. In *Photosynthetic Protein Complexes*. (Fromme P., ed.). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, pp. 23-64.
- Krupinska K., Biswal U.C. and Biswal B.** (2013) The Dynamic Role of Chloroplasts in Integrating Plant Growth and Development. In *Plastid Development in Leaves During Growth and Senescence*. (Biswal B., Krupinska K. and Biswal U.C., eds.). Heidelberg-Dordrecht-London-New York: Springer, pp. 3–16.
- Kupsch C., Ruwe H., Gusewski S., Tillich M., Small I. and Schmitz-Linneweber C.** (2012) Arabidopsis chloroplast RNA binding proteins CP31A and CP29A associate with large transcript pools and confer cold stress tolerance by influencing multiple chloroplast RNA processing steps. *The Plant Cell*, **24**, 4266–4280.
- Kushwaha R., Singh A. and Chattopadhyay S.** (2008) Calmodulin7 plays an important role as transcriptional regulator in Arabidopsis seedling development. *The Plant Cell*, **20**, 1747–1759.
- Lee S., Owen H.A., Prochaska D.J. and Barnum S.** (2000) HSP16.6 is involved in the development of thermotolerance and thylakoid stability in the unicellular cyanobacterium, *Synechocystis sp.* PCC 6803. *Curr. Microbiol.*, **40**, 283–287.
- Lehmann J., Atzorn R., Brückner C., Reinbothe S., Leopold J., Wasternack C. and Parthier B.** (1995) Accumulation of jasmonate, abscisic acid, specific transcripts and proteins in osmotically stressed leaf segments. *Planta*, **197**, 156–162.

- Lepistö A., Kangasjärvi S., Luomala E.M., Brader G. and Sipari N.** (2009) Chloroplast NADPH-thioredoxin reductase interacts with photoperiodic development in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **149**, 1261–1276.
- Li X., Duan X., Jiang H., Sun Y., Tang Y., Yuan Z., Guo J., Liang W., Chen L., Yin J., Ma H., Wang J. and Zhang D.** (2006) Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in rice and Arabidopsis. *Plant Physiology*, **141**, 1167–1184.
- Li M., Berendzen K.W. and Schoffl F.** (2010) Promoter specificity and interactions between early and late Arabidopsis heat shock factors. *Plant Mol. Biol.*, **73**, 559–567.
- Liang Q., Lu X., Jiang L., Wang C., Fan Y. and Zhang C.** (2010) EMB1211 is required for normal embryo development and influences chloroplast biogenesis in Arabidopsis. *Physiol. Plant.*, **140**, 380–394.
- Lichtenthaler H.K. and Buschmann C.** (2001) Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. *Current Protos. in Food Anal. Chem.*, F4.3.1–F4.3.8.
- Liu W.J., Yuan S., Zhang N.H., Lei T., Duan H.G., Liang H.G. and Lin H.H.** (2006) Effect of water stress on photosystem 2 in two wheat cultivars. *Biologia Plantarum*, **50**, 597–602.
- Liu Z. and Chang W.** (2008) Structure of the Light-Harvesting Complex II. In *Photosynthetic Protein Complexes* (Fromme P., ed.). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, pp. 217–242.
- Liu H.C., Liao H.T. and Charng Y.Y.** (2011) The role of class A1 heat shock factors (HSFA1s) in response to heat and other stresses in Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment*, **34**, 738–751.
- Lohmann C., Eggers-Schumacher G., Wunderlich M. and Schoffl F.** (2004) Two different heat shock transcription factors regulate immediate early expression of stress genes in Arabidopsis. *Mol. Genet. Genomics*, **271**, 11–21.
- Lu Y., Hall D.A. and Last R.L.** (2011) A small zinc finger thylakoid protein plays a role in maintenance of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **2**, 1861–1875.
- Lujan R., Lledias F., Martinez L.M., Barreto R., Cassab G.I. and Nieto-Sotelo J.** (2009) Small heat-shock proteins and leaf cooling capacity account for the unusual heat tolerance of the central spike leaves in *Agave tequilana* var. Weber. *Plant, Cell and Environment*, **32**, 1791–1803.

- Lundin B., Nurmi M., Rojas-Stuetz M., Aro E.M., Adamska I. and Spetea C.** (2008) Towards understanding the functional difference between the two PsbO isoforms in *Arabidopsis thaliana* insights from phenotypic analyses of *psbo* knockout mutants. *Photosynth. Res.*, **98**, 405–414.
- Mariaux J.B., Bockel C., Salamini F. and Bartels D.** (1998) Desiccation- and abscisic acid-responsive genes encoding major intrinsic proteins (MIPs) from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Molecular Biology*, **38**, 1089–1099.
- Markwell M.A., Haas S.M., Bieber L.L. and Tolbert N.E.** (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.*, **87**, 206–210.
- Marsh J.T., Sullivan S., Hartwell J. and Nimmo H.G.** (2003) Structure and expression of phosphoenolpyruvate carboxylase kinase genes in Solanaceae. A novel gene exhibits alternative splicing. *Plant Physiology*, **133**, 2021–2028.
- Masuda T., Fusada N., Shiraishi T., Kuroda H., Awai K., Shimada H., Ohta H. and Takamiya K.** (2002) Identification of two differentially regulated isoforms of protochlorophyllide oxidoreductase (POR) from tobacco revealed a wide variety of light- and development-dependent regulations of POR gene expression among angiosperms. *Photosynthesis Research*, **74**, 165–172.
- McDonald E.T., Bortolu M., Koteiche H.A. and McHaourab H.S.** (2012) Sequence, structure, and dynamic determinants of Hsp27 (HspB1) equilibrium dissociation are encoded by the N-terminal domain. *Biochemistry*, **51**, 1257–1268.
- McHaourab H.S., Godar J.A. and Stewart P.L.** (2009) Structure and mechanism of protein stability sensors: chaperone activity of small heat shock proteins. *Biochemistry*, **48**, 3828–3837.
- Miller G. and Mittler R.** (2006) Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? *Ann. Bot.*, **98**, 279–288.
- Mishra S.K., Tripp J., Winkelhaus S., Tschiersch B., Theres K., Nover L. and Scharf K.D.** (2002) In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato *Genes Dev.*, **16**, 1555–1567.

**Mittal D., Chakrabarti S., Sarkar A., Singh A. and Grover A.** (2009) Heat shock factor gene family in rice: genomic organization and transcript expression profiling in response to high temperature, low temperature and oxidative stresses. *Plant Physiol. Biochem.*, **47**, 785–795.

**Miyake T., Araki S. and Tsuchido T.** (1993) Synthesis and sedimentation of a subset of 15 kDa heat shock proteins in *Escherichia coli* cells recovering from sublethal heat stress. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 578–583.

**Morimoto R.I.** (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators; *Genes Dev.*, **12**, 3788–3796.

**Mulisch M. and Krupinska K.** (2013) Ultrastructural Analyses of Senescence Associated Dismantling of Chloroplasts Revisited. In *Plastid Development in Leaves During Growth and Senescence*. (Biswal B., Krupinska K. and Biswal U.C., eds). Heidelberg-Dordrecht-London-New York: Springer, pp. 307–335.

**Murashige Y. and Skoog F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, **15**, 473–497.

**Nakamoto H., Suzuki N. and Roy S.K.** (2000) Constitutive expression of a small heat-shock protein confers cellular thermotolerance and thermal protection to the photosynthetic apparatus in cyanobacteria. *FEBS Lett.*, **483**, 169–174.

**Nakamoto H. and Vigh L.** (2007) The small heat shock proteins and their clients. *Cell. Mol. Life Sci.*, **64**, 294–306.

**Nanba O. and Satoh K.** (1987) Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome *b*-559. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 109–112.

**Narsai R., Castleden I. and Whelan J.** (2010) Common and distinct organ and stress responsive transcriptomic patterns in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.*, **10**, 262.

**Naver H., Boudreau E. and Rochaix J.D.** (2001) Functional Studies of Ycf3: Its Role in Assembly of Photosystem I and Interactions with Some of Its Subunits. *The Plant Cell*, **13**, 2731–2745.

**Nelson N. and Yocum C.F.** (2006) Structure and Function of Photosystems I and II. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**, 521–65

- Neta-Sharir I., Isaacson T., Lurie S. and Weiss D.** (2005) Dual role for tomato heat shock protein 21: protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation. *The Plant Cell*, **17**, 1829–1838.
- Neuhoff V., Arold N., Taube D. and Ehrhardt W.** (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis*, **9**, 255–262.
- Nishiyama Y., Allakhverdiev S.I. and Murata N.** (2011) Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Physiol. Plant.*, **142**, 35–46.
- Nishizawa A., Yabuta Y., Yoshida E., Maruta T., Yoshimura K. and Shigeoka S.** (2006) Arabidopsis heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *Plant J.*, **48**, 535–547.
- Nishizawa-Yokoi A., Yoshida E., Yabuta Y. and Shigeoka S.** (2009) Analysis of the regulation of target genes by an Arabidopsis heat shock transcription factor, HsfA2, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 890–895.
- Nishizawa-Yokoi A., Nosaka R., Hayashi H., Tainaka H., Maruta T., Tamoi M., Ikeda M., Ohme-Takagi M., Yoshimura K., Yabuta Y. and Shigeoka S.** (2011) HsfA1d and HsfA1e involved in the transcriptional regulation of HsfA2 function as key regulators for the Hsf signaling network in response to environmental stress. *Plant Cell Physiol.*, **52**, 933–945.
- Nixon P.J., Sarcina M. and Diner B.A.** (2005) Photosystem II: the light-driven water:plastoquinone oxidoreductase. In *Advances in Photosynthesis and Respiration*. (Satoh K. and Wydrzynski T.J., eds.). Dordrecht, The Netherlands: Springer, pp. 71–94.
- Nixon P.J., Michoux F., Yu J., Boehm M. and Komenda J.** (2010) Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II. *Ann. Bot.*, **106**, 1–16.
- Nixon P.J., Michoux F., Yu J., Boehm M. and Komenda J.** (2010) Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II. *Ann. Bot.*, **106**, 1–16.
- Noodén L.D.** (1988) The phenomena of senescence and aging. In *Senescence and aging in plants*. (Noodén L.D. and Leopold A.C., eds.) San Diego, California, USA: Academic, pp 1–50.

**Noodén L.D.** (2013) Defining Senescence and Death in Photosynthetic Tissues. In *Plastid Development in Leaves During Growth and Senescence*. (Biswal B., Krupinska K. and Biswal U.C., eds). Heidelberg-Dordrecht-London-New York: Springer, pp. 283–306.

**Nover L.** (ed.) (1991) Heat shock response. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press.

**Nover L., Bharti K., Doring P., Mishra S.K., Ganguli A. and Scharf K.D.** (2001) Arabidopsis and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress & Chaperones*, **6**, 177–189.

**Ogawa D., Yamaguchi K. and Nishiuchi T.** (2007) High-level overexpression of the Arabidopsis HsfA2 gene confers not only increased thermotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth. *J. Exp. Bot.*, **58**, 3373–3383.

**Osteryoung K.W. and Vierling E.** (1992) Genetic approaches to the function of the chloroplast low molecular weight heat shock protein. In *Research in Photosynthesis*. (Murata N., ed.). Kluwer Academic Publishers, pp. 129–136.

**Ozawa S.I., Onishi T. and Takahashi Y.** (2010) Identification and characterization of an assembly intermediate subcomplex of Photosystem I in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.*, **285**, 20072–20079.

**Pan X., Liu Z., Li M. and Chang W.** (2013) Architecture and function of plant light-harvesting complexes II. *Current Opinion in Structural Biology*, **23**, 515–525.

**Personat J.M., Tejedor-Cano J., Prieto-Dapena P., Almoguera C. and Jordano J.** (2014) Co-overexpression of two Heat Shock Factors results in enhanced seed longevity and in synergistic effects on seedling tolerance to severe dehydration and oxidative stress. *BMC Plant Biol.*, **14**, 56.

**Porembski S.** (2011) Evolution, diversity and habitats of poikilohydrous plants. In *Plant desiccation tolerance*. (Luttge U., Beck E. and Bartels D., eds.) Berlin, Germany: Springer, pp. 139–156.

**Prändl R., Hinderhofer K., Eggers S.G. and Schöffl F.** (1998) HSF3, a new heat shock factor from *Arabidopsis thaliana*, derepresses the heat shock response and confers thermotolerance when overexpressed in transgenic plants. *Mol. Gen. Genet.*, **258**, 269–278.



- Prieto-Dapena P., Castaño R., Almoguera C. and Jordano J.** (2006) Improved resistance to controlled deterioration in transgenic seeds. *Plant Physiol.*, **142**, 1102-1112.
- Prieto-Dapena P., Castaño R., Almoguera C. and Jordano J.** (2008) The ectopic overexpression of a seed-specific transcription factor, *HaHSFA9*, confers tolerance to severe dehydration in vegetative organs. *Plant J.*, 2008, 54, 1004-1114.
- Proctor M.C., Oliver M.J., Wood A.J., Alpert P., Stark L.R., Cleavitt N.L. and Mishler B.D.** (2007) Desiccation tolerance in bryophytes: a review. *Bryologist*, **110**, 595–621.
- Rajjou L. and Debeaujon I.** (2008) Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *C. R. Biologies*, **331**, 796–805.
- Rapala-Kozik M., Kowalska E. and Ostrowska K. (2008) Modulation of thiamine metabolism in *Zea mays* seedlings under conditions of abiotic stress. *J. Exp. Bot.*, **59**, 4133–4143.
- Ribeiro D.T., Farias L.P., de Almeida J.D., Kashiwabara P.M., Ribeiro A.F., Silva-Filho M.C., Menck C.F. and Van Sluys M.A.** (2005) Functional characterization of the *thi1* promoter region from *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.*, **56**, 1797–1804.
- Rokka A., Suorsa M., Saleem A., Battchikova N. and Aro E.V.** (2005) Synthesis and assembly of thylakoid protein complexes: multiple assembly steps of photosystem II. *Biochem. J.*, **388**, 159–168.
- Rousselin P., Molinier J., Himber C., Schontz D., Prieto-Dapena P., Jordano J., Martini N., Weber S., Horn R. and Ganssmann M.** (2002) Modification of sunflower oil quality by seed-specific expression of a heterologous D9-stearoyl-(acyl carrier protein) desaturase gene. *Plant Breed*, **121**, 108–116.
- Sabater B. and Martín M.** (2013) Chloroplast Control of Leaf Senescence. In *Plastid Development in Leaves During Growth and Senescence*. (Biswal B., Krupinska K. and Biswal U.C., eds.). Heidelberg-Dordrecht-London-New York: Springer, pp. 529–550.
- Sakuma Y., Maruyama K., Qin F., Osakabe Y., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K.** (2006) Dual function of an *Arabidopsis* transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 18822–18827.

- Sakuraba Y., Rahman M.L., Cho S.H., Kim Y.S., Koh H.J., Yoo S.C. and Paek N.C.** (2013) The rice faded green leaf locus encodes protochlorophyllide oxidoreductase B and is essential for chlorophyll synthesis under high light conditions. *The Plant Journal*, **74**, 122–133.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T.** (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanz-Barrio R., Fernández-San Millán. A, Carballada J., Corral-Martínez P., Seguí-Simarro J.M. and Farran I.** (2012) Chaperone-like properties of tobacco plastid thioredoxins f and m. *J. Exp. Bot.*, **63**, 365–379.
- Sarkar N.K., Kim Y.K. and Grover A.** (2009) Rice sHsp genes: genomic organization and expression profiling under stress and development. *BMC Genomics*, **10**, 393.
- Sayed S.A. and Gadallah M.A.A.** (2002) Effects of shoot and root application of thiamin on salt-stressed sunflower plants. *Plant Growth Regul.*, **36**, 71–80.
- Schramm F., Ganguli A., Kiehlmann E., Englich G., Walch D. and von Koskull-Doring P.** (2006) The heat stress transcription factor HsfA2 serves as a regulatory amplifier of a subset of genes in the heat stress response in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.*, **60**, 759–772.
- Schramm F., Larkindale J., Kiehlmann E., Ganguli A., Englich G., Vierling E. and P. von Koskull-Doring.** (2008) A cascade of transcription factor DREB2A and heat stress transcription factor HsfA3 regulates the heat stress response of Arabidopsis. *Plant J.*, **53**, 264–274.
- Scharf K.D., Höhfeld I. and Nover L.** (1998a) Heat stress response and heat stress transcription factors. *J. Biosci.*, **23**, 313–329.
- Scharf K.D., Heider H., Hohfeld I., Lyck R., Schmidt E. and Nover L.** (1998b) The tomato Hsf system: HsfA2 needs interaction with HsfA1 for efficient nuclear import and may be localized in cytoplasmic heat stress granules. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 2240–2251.
- Scharf K.D., Siddique M. and Vierling E.** (2001) The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing alpha-crystallin domains Accl proteins. *Cell Stress & Chaperones*, **6**, 225–237.
- Scharf K.D., Berberich T., Ebersberger I. and Nover L.** (2012) The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function and evolution. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1819**, 104–119.

- Scheller H.V., Jensen P.E., Haldrup A., Lunde C. and Knoetzel J.** (2001) Role of subunits in eukaryotic Photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1507**, 41-60.
- Schmid M., Davison T., Henz S., Pape U., Demar M., Vingron M., Scholkopf B., Weigel D. and Lohmann J.** (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat. Genet.*, **37**, 501–506.
- Schmidt G.W. and Delaney S.K.** (2010) Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. *Mol. Genet. Genomics*, **283**, 233-241.
- Schnepf E.** (1980) Types of plastids: their development and interconversions. *Results Probl. Cell Differ.*, **10**, 1-27.
- Schöffl F., Prändl R. and Reindl A.** (1998) Regulation of the heat shock response. *Plant Physiol.*, **117**, 1135–1141.
- Schwenkert S., Umate P., Dal Bosco C., Volz S., Mlčochová L., Zoryan M., Eichacker L.A., Ohad I., Herrmann R.G. and Meurer J.** (2006) PsbI affects the stability, function, and phosphorylation patterns of Photosystem II assemblies in tobacco. *J. Biol. Chem.*, **281**, 34227–34238.
- Shen J.R., Henmi T. and Kamiya N.** (2008) Structure and Function of Photosystem II. In *Photosynthetic Protein Complexes*. (Fromme P., ed.). Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, pp. 83-106.
- Shim D., Hwang J.U., Lee J., Lee S., Choi Y., An G., Martinoia E. and Lee Y.** (2009) Orthologs of the class A4 heat shock transcription factor HsfA4a confer cadmium tolerance in wheat and rice. *Plant Cell*, **21**, 4031–4043.
- Siddique M., Gernhard S., von Koskull-Döring P., Vierling E. and Scharf K.D.** (2008) The plant sHSP superfamily: five new members in *Arabidopsis thaliana* with unexpected properties. *Cell Stress & Chaperones*, **13**, 183–197.
- Song W.Y., Hörtensteiner S., Tomioka R., Lee Y. and Martinoia E.** (2011) Common functions or only phylogenetically related? The large family of PLAC8 motif-containing/PCR genes. *Mol. Cells*, **31**, 1-7.
- Sonoike K.** (2011). Photoinhibition of photosystem I. *Physiol. Plant.*, **142**, 56-64.

**Sorensen J.G., Kristensen T.N. and Loeschcke V.** (2003) The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, **6**, 1025–1037.

**Stacey M.G., Patel A., McClain W.E., Mathieu M., Remley M., Rogers E.E., Gassmann W., Blevins D.G. and Stacey G.** (2008) The Arabidopsis AtOPT3 protein functions in metal homeostasis and movement of iron to developing deids. *Plant Physiology*, **146**, 589–601.

**Suarez-Rodriguez M.C., Edsgård D., Hussain S.S., Alquezar D., Rasmussen M., Gilbert T., Nielsen B.H., Bartels D. and Mundy J.** (2010) Transcriptomes of the desiccation-tolerant resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *The Plant Journal*, **63**, 212–228.

**Suorsa M., Sirpio S., Allahverdiyeva Y., Paakkarinen V., Mamedov F., Styring S. and Aro E.M.** (2006) PsbR, a missing link in the assembly of the oxygen-evolving complex of plant photosystem II. *J. Biol. Chem.*, **281**, 145–150.

**Sun Y. and MacRae T.H.** (2005) Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 2460-2476.

**Sundby C., Härndahl U., Gustavsson N., Ahrman E. and Murphy D.J.** (2005) Conserved methionines in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **1703**, 191-202.

**Takahashi S. and Badger M.R.** (2011) Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends Plant Sci.*, **16**, 53-60.

**Tejedor-Cano J., Prieto-Dapena P., Almoguera C., Carranco R., Hiratsu K., Ohme-Takagi M. and Jordano J.** (2010) Loss of function of the HSF A9 seed longevity program. *Plant, Cell and Environment*, **33**, 1408-1417.

**Tejedor-Cano J., Carranco R., Personat J.M., Prieto-Dapena P., Almoguera C., Espinosa J.M. and Jordano J.** (2014) A passive repression mechanism that hinders synergic transcriptional activation by heat shock factors involved in sunflower seed longevity. *Mol. Plant*, **7**, 256-259.

**Theodoulou F.L.** (2000) Plant ABC transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1465**, 79-103.

**Thomas H. and de Villiers L.** (2006) Gene expression in leaves of *Arabidopsis thaliana* induced to senesce by nutrient deprivation. *J Exp Bot.*, **47**, 1845-1918.

**Tikkanen M., Mekala N.R. and Aro E.M.** (2014) Photosystem II photoinhibition-repair cycle protects Photosystem I from irreversible damage. *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 210–215.

**Török Z., Goloubinoff P., Horváth I., Tsvetkova N.M., Glatz A., Balogh G., Varvasovszki V., Los D.A., Vierling E., Crowe J.H. and Vigh L.** (2001) *Synechocystis* HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-mediated refolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 3098-3103.

**Towbin H., Staehelin T. and Gordon J.** (1979) Electrophoresis transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354.

**Tripp J., Mishra S.K. and Scharf K.D.** (2009) Functional dissection of the cytosolic chaperone network in tomato mesophyll protoplasts. *Plant Cell Environ.*, **32**, 123–133.

**Tsvetkova N.M., Horváth I., Török Z., Wolkers W.F., Balogi Z., Shigapova N., Crowe L.M., Tablin F., Vierling E., Crowe J.H. and Vigh L.** (2002) Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 13504-13509.

**Tunc-Ozdemir M., Miller G., Song L., Kim J., Sodek A., Koussevitzky S., Misra., Mittler R. and Shintani D.** (2009) Thiamin Confers Enhanced Tolerance to Oxidative Stress in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **151**, 421–432.

**Tyedmers J., Mogk A. and Bukau B.** (2010) Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, **11**, 777–788.

**van Montfort R., Slingsby C. and Vierling E.** (2002) Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Advances in Protein Chemistry*, **59**, 105–156.

**Veena, Reddy V.S. and Sopory S.K.** (1999) Glyoxalase I from *Brassica juncea*: molecular cloning, regulation and its over-expression confer tolerance in transgenic tobacco under stress. *Plant J.*, **17**, 385-395.

**Vij S. and Tyagi A.K.** (2006) Genome-wide analysis of the stress associated protein (SAP) gene family containing A20/AN1 zinc-finger(s) in rice and their phylogenetic relationship with Arabidopsis. *Mol. Gen. Genomics*, **276**, 565–575.

**Volkov R.A., Panchuk I.I. and Schoffl F.** (2005) Small heat shock proteins are differentially regulated during pollen development and following heat stress in tobacco. *Plant Molecular Biology*, **57**, 487–502.

**von Koskull-Doring P., Treuter E., Kistner C., Lyck R., Chen A., and Nover, L.** (2000) The role of AHA motifs in the activator function of tomato heat stress transcription factors HsfA1 and HsfA2. *Plant Cell*, **12**, 265-278.

**von Koskull-Doring P., Scharf K.D. and Nover L.** (2007) The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends Plant Sci.*, **12**, 452–457.

**Wang C., Zhang Q. and Shou H.X.** (2009) Identification and expression analysis of OsHsfs in rice. *J. Zhejiang Univ. Sci., B.*, **10**, 291–300.

**Waters E.R.** (1995) The molecular evolution of the small heat shock proteins in plants. *Genetics*, **141**, 785–795.

**Waters E.R., Aebermann B.D. and Sanders-Reed Z.** (2008) Comparative analysis of the small heat shock proteins in three angiosperm genomes identifies new subfamilies and reveals diverse evolutionary patterns. *Cell Stress & Chaperones*, **13**, 127–142.

**Waters E.R.** (2013) The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs. *J. Exp Bot.*, **64**, 391-403.

**Wehmeyer N., Hernandez L.D., Finkelstein R.R. and Vierling E.** (1996) Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiology*, **112**, 747–757.

**Wehmeyer N. and Vierling E.** (2000) The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiology*, **122**, 1099–1108.

**Wei J.Z., Chatterton N.J., Wang R.R.C. and Larson S.R.** (2002) Characterization of mRNAs that accumulate during illumination of excised leaves of big bluegrass (*Poa secunda*). *J. Plant Physiol.*, **159**, 661–670.

**Wu C.** (1995) Heat stress transcription factors. *Annu. Rev. Cell Biol.*, **11**, 441–469.

**Xin H., Zhang H., Chen L., Li X., Lian Q., Yuan X., Hu X., Cao L., He X. and Yi M.** (2010) Cloning and characterization of HsfA2 from Lily (*Lilium longiflorum*). *Plant Cell Reports*, **29**, 875-885.

- Yadavalli V., Malledaza C. and Subramanyam R.** (2011) Protein–protein interactions by molecular modeling and biochemical characterization of PSI-LHCI supercomplexes from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. BioSyst.*, **7**, 3143–3151
- Yamanouchi U., Yano M., Lin H., Ashikari M. and Yamada K.** (2002) A rice spotted leaf gene, *Sp17*, encodes a heat stress transcription factor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 7530–7535.
- Ye L.H., Li Y.Q., Fukami-Kobayashi K., Go M., Konishi T., Watanabe A. and Sugiura M.** (1991) Diversity of a ribonucleoprotein family in tobacco chloroplasts: two new chloroplast ribonucleoproteins and a phylogenetic tree of ten chloroplast RNA-binding domains. *Nucleic Acids Res.*, **19**, 6485–6490.
- Yi X., Hargett S.R., Liu H., Frankel L.K. and Bricker T.M.** (2007) The PsbP protein is required for photosystem II complex assembly/stability and photoautotrophy in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, **282**, 24833–24841.
- Yi X., Hargett S.R., Frankel L.K. and Bricker T.M.** (2009) The PsbP protein, but not the PsbQ protein, is required for normal thylakoid architecture in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, **583**, 2142–2147.
- Yokotani N., Ichikawa T., Kondou Y., Matsui M., Hirochika H., Iwabuchi M. and Oda K.** (2008) Expression of rice heat stress transcription factor *OsHsfA2e* enhances tolerance to environmental stresses in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*, **227**, 957–967.
- Yoshida T., Sakuma Y., Todaka D., Maruyama K., Qin F., Mizoi J., Kidokoro S., Fujita Y., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K.** (2008) Functional analysis of an *Arabidopsis* heat-shock transcription factor *HsfA3* in the transcriptional cascade downstream of the DREB2A stress-regulatory system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **368**, 515–521.
- Zarsky V., Garrido D., Eller N., Tupy J., Vicente O., Schoffl F. and Heberle-Bors E.** (1995) The expression of a small heat shock gene is activated during induction of tobacco pollen embryogenesis by starvation. *Plant, Cell and Environment*, **18**, 139–147.
- Zhang L., Li Y., Xing D. and Gao C.** (2009) Characterization of mitochondrial dynamics and subcellular localization of ROS reveal that *HsfA2* alleviates oxidative damage caused by heat stress in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.*, **60**, 2073–2091.

**Zhao L., Luo Q., Yang C., Han Y. and Li W.** (2008) A RAV-like transcription factor controls photosynthesis and senescence in soybean. *Planta*, **227**, 1389–1399.

**Zhong L., Zhou W., Wang H., Ding S., Lu Q., Wen X., Peng L., Zhang L. and Lu C.** (2013) Chloroplast Small Heat Shock Protein HSP21 Interacts with Plastid Nucleoid Protein pTAC5 and Is Essential for Chloroplast Development in Arabidopsis under Heat Stress. *Plant Cell*, **25**, 2925–2943.

**Zhu J.K.** (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **53**, 247–273.



## **Anexo I**

Clasificación de los genes posiblemente inducidos en  
las plántulas 35S:A9



**Clasificación de los genes aislados a partir de la genoteca de hibridación sustractiva.** Los genes se clasificaron en función del componente celular donde realizan su actividad, o en función al proceso biológico en el que participan. Aparecen subrayados los genes seleccionados para el análisis por RT-qPCR.

Genes	Componente Celular	Proceso Biológico	Descripción
Metiltransferasa	Aparato de Golgi	Proceso biológico desconocido	Proteína de la familia de las metiltransferasas.
Asp-ARNt Sintetasa	Citosol	Metabolismo de proteínas	Proteína de la familia ARNt sintetasa Clase II. Las proteínas aminoacil-ARNt sintetasa son enzimas esenciales para la traducción de las proteínas. Una mutación de la Ala-ARNt sintetasa conlleva embriones letales, por lo cual, las ARNt sintetas parecen ser esenciales durante la embriogénesis (Kim <i>et al.</i> , 2005).
<u>PEPC</u>	Citosol	Otros procesos biológicos	La enzima Fosfo-enol-piruvato carboxilasa (PEPC) cataliza la fijación primaria del CO <sub>2</sub> . Cataliza la carboxilación de fosfo-enol-piruvato para formar oxaloacetato y fosfato inorgánico (Marsh <i>et al.</i> , 2003).
Gliosialasa I	Citosol	Respuesta a estímulos abióticos o bióticos	La enzima Gliosialasa I o lactoilglutation liasa cataliza el primer paso de la destoxificación de metilglioxal. Relacionada con la tolerancia a estrés oxidativo (Veena <i>et al.</i> , 1999).
Proteína Biosíntesis de Piridoxina	Citosol	Otros procesos metabólicos	Proteína putative de biosíntesis de piridoxina, isoforma A. Proteína similar a PDX-1. PDX-1 participa en la biosíntesis de vitamina B <sub>6</sub> , esencial para desarrollo y la tolerancia a estrés en Arabidopsis (Chen & Xiong, 2009).
Alfa Tubulina	Citosol	Organización celular y biogénesis	Componente de los microtúbulos.
Calmodulina	Citosol	Transducción de señal	En Arabidopsis CaM7 es un regulador transcripcional que interacciona directamente con los promotores de genes inducibles por luz y promueve la fotomorfogénesis (Kushwaha <i>et al.</i> , 2008).

Factor de inicio de la traducción eIF-5A	Citosol	Metabolismo de proteínas	Factor de inicio de la traducción eIF-5A.
<u>PetM</u>	Cloroplastos	Transporte de electrones o rutas energéticas	Subunidad del citocromo <i>b<sub>6</sub>f</i> , codificada por el genoma nuclear. El complejo citocromo <i>b<sub>6</sub>f</i> transfiere los electrones desde el PSII al PSI (Fromme & Grotjohann, 2008).
NAD(P)-linked oxidorreductasa (similar)	Cloroplastos	Transporte de electrones o rutas energéticas	Proteína de la superfamilia NAD(P)-linked oxidorreductasa. Actividad oxidorreductasa. Localización cloroplástica.
Ribonucleoproteína CP29B	Cloroplastos	Respuesta a estímulos abióticos o bióticos	Ribonucleoproteína B. Proteína de unión a ARN con localización cloroplástica. Podría estar implicada en el <i>splicing</i> o procesamiento del ARN cloroplástico (Ye <i>et al.</i> , 1991).
<u>sHSP-P</u>	Cloroplastos	Respuesta a estímulos abióticos o bióticos	Proteína de choque térmico sHSP de localización plastidial.
<u>PsbP</u>	Cloroplastos	Transporte de electrones o rutas energéticas	Subunidad extrínseca del PSII, componente estructural del complejo OEC (Allahverdiyeva <i>et al.</i> , 2007). Necesaria para el ensamblaje y estabilización del PSII (Yi <i>et al.</i> , 2007, 2009).
Ribonucleoproteína CP29A	Cloroplastos	Respuesta a estímulos abióticos o bióticos	Ribonucleoproteína A. Proteína de unión a ARN con localización cloroplástica. Podría estar implicada en el <i>splicing</i> o procesamiento del ARN cloroplástico (Ye <i>et al.</i> , 1991). En <i>Arabidopsis</i> , C29A está relacionada con la tolerancia a frío (Kupsch <i>et al.</i> , 2012).
<u>Rubredoxina (similar)</u>	Cloroplastos	Otros procesos celulares	Proteína similar a la rubredoxina. Las rubredoxinas actúan como transportadores de electrones en gran variedad de procesos bioquímicos. Se ha sugerido que las rubredoxinas específicas de los tilacoides son necesarias para la actividad normal del PSII (Calderon <i>et al.</i> , 2013).

<u>Ribulosa fosfato epimerasa</u>	Cloroplastos	Transporte de electrones o rutas energéticas	Enzima implicada en el ciclo de Calvin. Cataliza la interconversión de D-ribulosa-5-fosfato (Ru5P) y D-xilulosa-5-fosfato (Jelakovic <i>et al.</i> , 2003).
<u>NDPK II</u>	Cloroplastos	Respuesta a estímulos abióticos o bióticos	Proteína NDPK (nucleosido difosfato quinasa) de localización cloroplástica. En plantas las proteínas NDPK están implicadas en la embriogénesis y desarrollo de la semilla, así como en la respuesta a luz azul y alta fuerza iónica (Bölter <i>et al.</i> , 2007).
Proteína Desconocida	Cloroplastos	Transcripción	Factor de transcripción
<u>Tiorredoxina m</u>	Cloroplastos	Otros procesos metabólicos	Tiorredoxina cloroplástica con actividad dependiente de la luz. Las tiorredoxinas cloroplásticas reducen puentes disulfuros de proteínas dianas. En arroz, es esencial para el desarrollo de la de la planta (Chi <i>et al.</i> , 2008). Se ha sugerido su función chaperona frente a estrés oxidativo (Sanz-Barrio <i>et al.</i> , 2012).
Aminopeptidasa	Cloroplastos	Respuesta a estímulos abióticos o bióticos	Proteína proteolítica.
<u>PsbI</u>	Cloroplastos	Transporte de electrones o rutas energéticas	Subunidad del PSII codificada por el genoma plastidial. Implicada en la biogénesis del PSII. PsbI es necesaria para la estabilidad la unión de los supercomplejos PSII-LHCII (Schwenkert <i>et al.</i> , 2006).
<u>CP47 (PsbB)</u>	Cloroplastos	Transporte de electrones o rutas energéticas	Proteína de unión a clorofilas CP, componente del RC del PSII. Implicado en el ensamblaje del PSII (Fromme & Grotjohann, 2008).
<u>Atp-B</u>	Cloroplastos	Transporte de electrones o rutas energéticas	Subunidad CF <sub>1</sub> -β de la ATP sintasa cloroplástica.

Transportador de oligopeptidos OPT3	Cloroplastos	Transporte	En Arabidopsis, OPT3 es esencial para la movilización de hierro durante el desarrollo de la semilla, y para mantener la homeostasis de hierro en toda la planta. Un mutante nulo de AtOPT3 implica la letalidad del embrión, indicando que AtOPT3 es esencial durante el desarrollo del embrión (Stacey <i>et al.</i> , 2008).
<u>PsbR</u>	Cloroplastos	Transporte de electrones o rutas energéticas	Subunidad extrínseca del PSII, componente estructural del complejo OEC (Allahverdiyeva <i>et al.</i> , 2013). Necesaria para el ensamblaje estable de la subunidad PsbP (Suorsa <i>et al.</i> , 2006).
<u>PsaG</u>	Cloroplastos	Transporte de electrones o rutas energéticas	Componente del RC del PSI. Permite el anclaje del complejo LHCI al PSI (Ozawa <i>et al.</i> , 2010).
<u>PsbO1</u>	Cloroplastos	Transporte de electrones o rutas energéticas	Subunidad extrínseca del PSII, componente estructural del complejo OEC (Allahverdiyeva <i>et al.</i> , 2013).
Rubisco (RbcS)	Cloroplastos	Otros procesos metabólicos	Subunidad S de la enzima Rubisco. Cataliza la fijación de CO <sub>2</sub> .
Anhidrasa Carbonica $\beta$	Cloroplastos	Otros procesos metabólicos	Las enzimas anhidrasas carbónicas juegan un papel crucial en diversos procesos fisiológicos que implican reacciones de descarboxilación y/o carboxilación. En <i>Pennisetum glaucum</i> , la anhidrasa carbónica $\beta$ , se localiza en los cloroplastos, y se induce en respuesta a varios estreses abióticos (Kaul <i>et al.</i> , 2011).
<u>Tiamina Sintetasa</u>	Cloroplastos	Otros procesos metabólicos	Enzima implicada en la síntesis de tiamina o vitamina B1. Se ha sugerido que el metabolismo de la tiamina esté implicado en la protección contra diversos estreses (Ribeiro <i>et al.</i> , 2005; Ahn <i>et al.</i> , 2005; Tunc-Ozdemic <i>et al.</i> , 2009).

<u>AtpE</u>	Cloroplastos	Transporte de electrones o rutas energéticas	Subunidad CF <sub>1</sub> -ε de la ATP sintasa cloroplástica. Codificada por el genoma plastidial.
<u>Ycf3</u>	Cloroplastos	Transporte de electrones o rutas energéticas	Proteína implicada en el ensamblaje del PSI (Naver <i>et al.</i> , 2001).
Transportador ABC plastidial	Cloroplastos	Procesos de desarrollo	Las proteínas ABC actúan como transportadores dependientes de ATP. Además, algunas proteínas ABC también modulan la actividad de canales heterólogos o actúan como canales proteicos (Theodoulou, 2000).
Proteína ribosomal 50S L14	Cloroplastos	Metabolismo de proteínas	Subunidad 50S L14 de los ribosomas plastidiales.
Rubisco Activasa	Cloroplastos	Respuesta a estímulos abióticos o bióticos	Activasa de la Rubisco. Implicada en la fijación de carbono.
<u>PsaH</u>	Cloroplastos	Transporte de electrones o rutas energéticas	Subunidad del RC del PSI. Compone junto a PsaO, PsaI y PsaL el dominio de interacción con el complejo LHCII (Amunts <i>et al.</i> , 2007; Amunts & Nelson, 2008; Yadavalli <i>et al.</i> , 2011).
Proteína ribosomal 50S L28	Cloroplastos	Metabolismo de proteínas	Subunidad 50S L28 de los ribosomas plastidiales.
<u>AtpG</u>	Cloroplastos	Transporte de electrones o rutas energéticas	Subunidad CF <sub>0</sub> -II de la ATP sintasa cloroplástica.

PsbO1	Cloroplastos	Transporte de electrones o rutas energéticas	Subunidad extrínseca del PSII, componente estructural del complejo OEC (Allahverdiyeva <i>et al.</i> , 2013).
<u>POR-1</u>	Cloroplastos	Otros procesos metabólicos	NADPH-protoclorofilida oxidoreductasa 1. Enzima implicada en la ruta de biosíntesis de la clorofila. Cataliza la reducción dependiente de luz de la protoclorofilida hasta clorofilida, y es esencial para la formación de los cuerpos prolamelares (Masuda <i>et al.</i> , 2002; Sakuraba <i>et al.</i> , 2013).
PetB (subunidad citocromo b6f)	Cloroplastos	Transporte de electrones o rutas energéticas	Subunidad del citocromo <i>b<sub>6</sub>f</i> , codificada por el genoma nuclear. El complejo citocromo <i>b<sub>6</sub>f</i> transfiere los electrones desde el PSII al PSI (Fromme & Grotjohann, 2008).
<u>AtpD</u>	Cloroplastos	Transporte de electrones o rutas energéticas	Subunidad $\delta$ de la ATP sintasa cloroplástica. Codificada por el genoma plastidial.
<u>PsbX</u>	Cloroplastos	Transporte de electrones o rutas energéticas	Subunidad de bajo peso molecular del PSII. Importante para la acumulación de PSII funcional (García-Cerdán <i>et al.</i> , 2009).
<u>PsaO</u>	Cloroplastos	Transporte de electrones o rutas energéticas	Subunidad del RC del PSI. Compone junto a PsaO, PsaI y PsaL el dominio de interacción con el complejo LHCII (Amunts <i>et al.</i> , 2007; Amunts & Nelson, 2008; Yadavalli <i>et al.</i> , 2011).
<u>PsbH</u>	Cloroplastos	Transporte de electrones o rutas energéticas	Subunidad del PSII codificada por el genoma plastidial. Posiblemente implicado en la reparación del PSII tras la fotoinhibición (Rokka <i>et al.</i> , 2005).
<u>PsaN</u>	Cloroplastos	Transporte de electrones o rutas energéticas	Componente del RC del PSI. Posiblemente implicada en la unión de la plastocianina al PSI (Amunts <i>et al.</i> , 2007; Amunts & Nelson, 2008).



<u>CP29</u>	Cloroplastos	Transporte de electrones o rutas energéticas	Proteína de unión a clorofila a/b. Componente minoritario del LHCII. La fosforilación de CP29 bajo condiciones de estrés parece ser un prerequisite para el dismantelamiento de los supercomplejos del PSII y para el mecanismo de estado de transición del complejo LHCII entre el PSII y el PSI (Chen <i>et al.</i> , 2013).
Cisteína-proteasa	Extracelular	Metabolismo de proteínas	
Proteína BTB/POZ	Membrana plasmática	Respuesta a estímulos abióticos o bióticos	Factor de transcripción
<u>LRR quinasa</u>	Membrana plasmática	Transducción de señal	Proteína quinasa de los receptores LRR. Posiblemente implicada en la ruta de transducción de señal de respuesta frente a estrés osmótico en plantas (Alam <i>et al.</i> , 2010).
Polyol Transporter 6 (similar)	Membrana plasmática	Transporte	
Acuaporina MIP	Membrana plasmática	Respuesta a estímulos abióticos o bióticos	Familia de proteínas canal intrínsecas que funcionan como canales de agua (Mariaux <i>et al.</i> , 1997).
Acuaporina MIP	Membrana Plasmática	Respuesta a estímulos abióticos o bióticos	Familia de proteínas canal intrínsecas que funcionan como canales de agua (Mariaux <i>et al.</i> , 1997).

Aquaporin PIP	Membrana plasmática	Respuesta a estímulos abióticos o bióticos	Familia de proteínas canal intrínsecas que funcionan como canales de agua (Mariaux <i>et al.</i> , 1997).
Cell-Number regulator 6 (similar)	Membrana plasmática	Otros procesos biológicos	Proteína perteneciente a la superfamilia de proteínas PLAC8. En plantas, las proteínas con el motivo PLAC8 están implicadas en la determinación del tamaño del fruto y en el número celular. Además, en Arabidopsis, dos miembros de esta familia de proteínas, AtPCR1 y AtPCR2 juegan un papel importante en el transporte de metales pesados (Song <i>et al.</i> , 2011).
Oxidoreductasa inducida por Apoptosis	Mitocondrias	Procesos de desarrollo	
Proteína reprimida por Auxina	Núcleo	Proceso biológico desconocido	
Proteína quinasa Serina/Treonina	Núcleo	Metabolismo de proteínas	
Proteína reprimida por auxina	Núcleo	Otros procesos biológicos	
<u>SAP1/SAP5</u> (similar)	Núcleo	Metabolismo de proteínas	Proteína similar a las proteínas asociadas a estrés SAP1 y SAP5. Contiene dominios <i>zing-finger</i> A20 / AN1. Las proteínas SAP confieren tolerancia a estrés en plantas (Vij & Tyagi, 2006).
HaHSFA9	Núcleo	Transcripción	Factor de transcripción HaHSFA9.

C2H2 Zn-finger	Núcleo	Transcripción	Factor de transcripción
<u>bHLH61</u>	Núcleo	Transcripción	Factor de transcripción perteneciente a la familia de factores MYC R, esenciales para la diferenciación y el desarrollo de la planta (Li <i>et al.</i> , 2006; Carretero-Paulet <i>et al.</i> , 2010).
<u>MYB1</u>	Núcleo	Transcripción	Factor de transcripción MYB. Regula el metabolismo de la lignina. Posiblemente relacionado con la respuesta a estrés abiótico (Almeida <i>et al.</i> , 2013a, 2013b).
Histona 2B.1 (similar)	Núcleo	Metabolismo de ADN o ARN	Proteína similar a la histona 2B.1. Componente de la cromatina.
Proteína Nucleolar de unión a GTP	Núcleo	Otros procesos celulares	
Histona H3.2 (similar)	Núcleo	Metabolismo de ADN o ARN	Proteína similar a la histona H3.2. Componente de la cromatina.
Proteína relacionado con Kinetina	Núcleo	Proceso biológico desconocido	
Histona H3 (similar)	Núcleo	Metabolismo de ADN o ARN	Proteína similar a la histona H3. Componente de la cromatina.

Hidrolasa de la pared celular	Pared celular	Respuesta a estímulos abióticos o bióticos	
Pectina metil-esterasa	Pared celular	Otros procesos celulares	
Proteína ribosomal 40S S9	Ribosomas	Metabolismo de proteínas	Subunidad 40S S9 de los ribosomas
Proteína ribosomal 40S S18	Ribosomas	Metabolismo de proteínas	Subunidad 40S S18 de los ribosomas
Acuaporina TIP-1	Otras membranas	Respuesta a estímulos abióticos o bióticos	Familia de proteínas canal intrínsecas que funcionan como canales de agua en las vacuolas (Mariaux <i>et al.</i> , 1997).
Complejo AP-4, subunidad sigma-1	Otras membranas	Transporte	
Metiltransferasa de ácidos grasos	Otro componente celular	Otros procesos metabólicos	
Proteína P23 Tumor-like TCTP	Otro componente celular	Procesos de desarrollo	

Aciltransferasa	Otro componente celular	Otros procesos biológicos	
Metalotionina	Componente celular desconocido	Respuesta a estrés	Las metalotioneinas (MT) son una familia de proteínas con afinidad de unión a iones de metales pesados. Las proteínas MT están implicadas en la homeostasis de metales esenciales, y protegen contra la toxicidad de los metales pesados (Chaturvedi <i>et al.</i> , 2012).
Proteína de la superfamilia Protease inhibitor II	Componente celular desconocido	Proceso biológico desconocido	
Proteína Pit1 inducible por Al	Componente celular desconocido	Proceso biológico desconocido	
Proteína SnRK1-interacting	Componente celular desconocido	Proceso biológico desconocido	
ERF TF	Componente celular desconocido	Transcripción	Factor de transcripción de respuesta a etileno.
Proteína inducible por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Componente celular desconocido	Respuesta a estímulos abióticos o bióticos	
Metalotioneina	Componente celular desconocido	Respuesta a estrés	Las metalotioneinas (MT) son una familia de proteínas con afinidad de unión a iones de metales pesados. Las proteínas MT están implicadas en la homeostasis de metales esenciales, y protegen contra la toxicidad de los metales pesados (Chaturvedi <i>et al.</i> , 2012).

Proteína no caracterizada	Componente celular desconocido	Proceso biológico desconocido
Proteína no caracterizada	Componente celular desconocido	Proceso biológico desconocido
Proteína no caracterizada	Componente celular desconocido	Proceso biológico desconocido
Proteína no caracterizada	Componente celular desconocido	Proceso biológico desconocido
Proteína no caracterizada	Componente celular desconocido	Transducción de señal
Proteína no caracterizada	Componente celular desconocido	Proceso biológico desconocido
Proteína no caracterizada	Componente celular desconocido	Proceso biológico desconocido
Proteína no caracteriza	Componente celular desconocido	Proceso biológico desconocido

Proteína no caracteriza	Componente celular desconocido	Proceso biológico desconocido
Proteína no caracterizada	Componente celular desconocido	Proceso biológico desconocido
Proteína no caracterizada	Componente celular desconocido	Proceso biológico desconocido
Proteína no caracteriza	Componente celular desconocido	Proceso biológico desconocido





## **Anexo II**

Publicaciones derivadas del trabajo de esta Tesis



# Protection of the Photosynthetic Apparatus from Extreme Dehydration and Oxidative Stress in Seedlings of Transgenic Tobacco

Concepción Almoguera<sup>1</sup>✉, Pilar Prieto-Dapena<sup>1</sup>✉, José-María Personat<sup>1</sup>, Javier Tejedor-Cano<sup>1</sup>, Marika Lindahl<sup>2</sup>, Antonio Diaz-Espejo<sup>1</sup>, Juan Jordano<sup>1\*</sup>

**1** Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Seville, Spain, **2** Instituto de Biología Vegetal y Fotosíntesis, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Seville, Spain

## Abstract

A genetic program that in sunflower seeds is activated by Heat Shock transcription Factor A9 (HaHSFA9) has been analyzed in transgenic tobacco seedlings. The ectopic overexpression of the HSFA9 program protected photosynthetic membranes, which resisted extreme dehydration and oxidative stress conditions. In contrast, heat acclimation of seedlings induced thermotolerance but not resistance to the harsh stress conditions employed. The HSFA9 program was found to include the expression of plastidial small Heat Shock Proteins that accumulate only at lower abundance in heat-stressed vegetative organs. Photosystem II (PSII) maximum quantum yield was higher for transgenic seedlings than for non-transgenic seedlings, after either stress treatment. Furthermore, protection of both PSII and Photosystem I (PSI) membrane protein complexes was observed in the transgenic seedlings, leading to their survival after the stress treatments. It was also shown that the plastidial D1 protein, a labile component of the PSII reaction center, and the PSI core protein PsaB were shielded from oxidative damage and degradation. We infer that natural expression of the HSFA9 program during embryogenesis may protect seed pro-plastids from developmental desiccation.

**Citation:** Almoguera C, Prieto-Dapena P, Personat J-M, Tejedor-Cano J, Lindahl M, et al. (2012) Protection of the Photosynthetic Apparatus from Extreme Dehydration and Oxidative Stress in Seedlings of Transgenic Tobacco. PLoS ONE 7(12): e51443. doi:10.1371/journal.pone.0051443

**Editor:** Miguel A. Blazquez, Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Spain

**Received:** September 28, 2012; **Accepted:** November 1, 2012; **Published:** December 5, 2012

**Copyright:** © 2012 Almoguera et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was cofinanced by the European Regional Development Fund (FEDER) and the Spanish Ministry of Science and Innovation (Grants BIO2008-00634 and BIO2011-23440). Additional funds were obtained from the Andalusian Regional Government (Grant BIO148). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: juan.jordano@csic.es

✉ These authors contributed equally to this work.

## Introduction

In plant seeds the developing zygotic embryo survives desiccation. Mature seeds can germinate after prolonged storage leading to seed aging. The existence of different genetic programs that regulate at the same time seed longevity and embryonic desiccation tolerance has been proposed [1–4]; one of such programs is under control of Heat Shock transcription Factors (HSFs). HaHSFA9 in sunflower (*Helianthus annuus*, L.), and the orthologous HSFs (HSFA9) are expressed specifically in developing seeds [5,6]. The known target genes activated by HSFA9 (the HSFA9 program) encode different Heat Shock Proteins (HSPs), among them HSP101 and distinct subsets of small Heat Shock Proteins (sHSPs) that belong to the cytosol-localized CI and CII classes [1–3,6]. In sunflower these sHSPs include polypeptides that accumulate specifically (or predominantly) in developing seeds at normal growth temperature, but they do not so (or do it to lesser extent) in response to heat stress in vegetative organs. The seed-specific, or the 35S-driven overexpression of HaHSFA9 resulted in enhanced accumulation of the same subsets of cytosolic sHSPs [1,2]. In parallel, we observed enhanced seed longevity [1] and achieved tolerance to drastic levels of dehydration in vegetative organs [2], respectively.

The results of ectopic overexpression of the HSFA9 program in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L., [2]) turned our attention to the green organs, which survived drastic dehydration better than roots. The tolerated dehydration -losses of ≈98% of the initial amount of water- implied reaching very low water potentials (e.g.,  $\Psi$  below  $-30$  MPa). Survival under these conditions indicated the protection of membranes, including plastidial membranes. These observations lead us first to investigate if the activation of the HSFA9 program involves plastidial sHSPs. These sHSPs are encoded by the nuclear genome and targeted to the chloroplast. Precedents in the literature have showed that the plastidial sHSPs of higher plants can protect photosynthetic membranes and their components (e.g., [7–9]). However, the previous *in vivo* studies have investigated resistance to damage caused only by very moderate levels of stress, e.g., heat stress, high-light stress or both combined.

In chloroplasts, PSII is a critical site of damage by stress conditions such as dehydration, heat, high-light, and UV-B light [10]. PSI has generally been regarded as a stress-resistant photosystem compared to PSII, at least in normal plants subjected to moderate stress levels. Damage to PSI has been considered to take place only rarely *in vivo*, as in certain plant species or under specific environmental conditions, such as chilling [11]. In

particular, desiccation in the dark would irreversibly damage PSI of normal plants, but not of resurrection (desiccation-tolerant) plants (e.g., [12,13]). Reactive oxygen species (ROS), such as superoxide radicals, hydroxyl radicals and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), are produced in the stressed chloroplasts. These ROS cause critical oxidation and damage of PSII. Among the intrinsic components of the reaction center of PSII, the chloroplast-encoded D1 protein (PsbA) is particularly vulnerable to ROS damage [14,15]. The damage of the D1 protein causes reduction of oxygen evolution in the PSII and disruption of the photosynthetic electron flow [10]. Therefore, the D1 protein would be among the candidate targets that could be shielded from oxidative damage under the drastic stress conditions analyzed *in vivo* in this report. It should be remarked that these stress conditions were strong enough to damage not only PSII but also PSI within chloroplast of control non-transgenic plants.

In this work, it was found that the HSFA9 program includes plastidial sHSPs that are normally expressed in developing seeds but are present only in lower abundance in heat-stressed leaves. The ectopic overexpression of HaHSFA9 in green organs of tobacco seedlings protected membrane-protein complexes of the two photosystems. It also shielded the D1 protein of PSII and its synthesis from oxidative damage inferred by drastic dehydration or by very harsh treatments with  $H_2O_2$  (e.g., exposure to up to 200 mM  $H_2O_2$  for 24 h in the dark). The PSI core protein PsbA was also protected. Thus, protection at different structural levels might explain the limited and recoverable damage of PSI and PSII observed in the 35S:A9 seedlings. In contrast, heat acclimation of control non-transgenic seedlings induced thermotolerance but not resistance to the drastic stress conditions used in this study. Thus, target genes not activated in a typical heat-acclimation response in vegetative organs, but included in the HSFA9 program must explain the unusual stress resistance of the 35S:A9 seedlings. Among them, those encoding the cytosolic and plastidial seed sHSPs may have a partial role. We propose that the normal expression of the HSFA9 program, which occurs during zygotic embryogenesis, would protect maturing seed plastids from desiccation. The results reported here might open new ways to engineering the stress tolerance of photosynthetic organs.

## Results

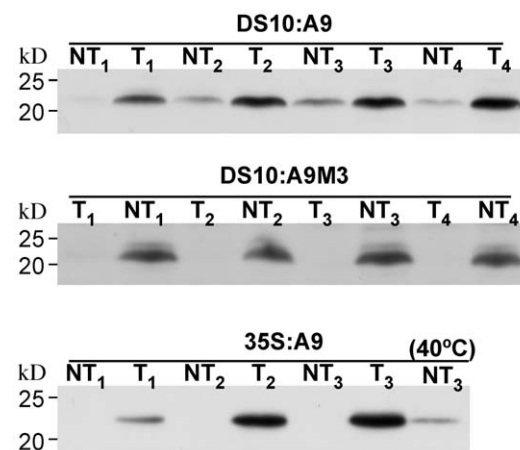
The seed HSFA9 program includes plastidial sHSPs that ectopically accumulate at high levels in the 35S:A9 seedlings

We first investigated whether genes encoding plastidial sHSPs are included in the HSFA9 program. To this end, commercial antibodies raised against HSP21 -a chloroplast-localized sHSP from *Arabidopsis*- were used. The accumulation of polypeptides detected by these antibodies was determined in transgenic lines that up-regulate (DS10:A9) or down-regulate (DS10:A9M3) the HSFA9 program in seed [1,3]. The observed patterns were then compared with the accumulation of these polypeptides in vegetative organs of heat-acclimated non-transgenic lines, and in non-stressed 35S:A9 lines. Each transgenic line (T) was compared with its sibling non-transgenic (NT) control syngenic line obtained by Mendelian segregation. The T lines represent different single integration events of the respective *HaHSFA9* transgenes in homozygosity. Different sibling T/NT pair lines were used for the experiments described in Figure 1 (see the legend). The same three pairs of sibling 35S:A9 lines [2] were also used for the rest of the experiments in this report. Mature seeds of the DS10:A9 lines, which display gain of function of the HSFA9 program, showed consistently higher accumulation levels of HSP21-like polypeptides

compared to the NT control lines (Figure 1, top). Conversely, loss of function of the HSFA9 program in the seeds of DS10:A9M3 lines abolished accumulation of these polypeptides compared to the respective NT control lines (Figure 1, middle). The specificity of the anti-HSP21 antibodies is evident, as the molecular mass of the detected polypeptides is consistent with that for processed plastidial sHSPs (mature forms without the chloroplast transit peptide). Furthermore, we did not detect the smaller polypeptides recognized by anti-CI- and anti-CII-sHSP antibodies: compare Figure 1 with data in our previous publications [1–3]. Thus, genes encoding plastidial sHSPs are activated during seed maturation as part of the HSFA9 program, as previously shown for different sHSPs. In control (non-stressed) NT seedlings we could not detect accumulation of HSP21-like polypeptides; in contrast seedlings of the 35S:A9 (T) lines accumulated these plastidial sHSPs. The accumulation level of plastidial sHSPs in the 35S:A9 seedlings was consistently much higher than observed with heat-acclimated NT seedlings, where treatments for 3 h at 40°C induced plastidial sHSPs as expected (Figure 1, bottom). We also showed partial association to thylakoid membranes, under unstressed growth conditions, of the plastidial sHSPs overexpressed in the T lines. These plastidial sHSPs showed a thylakoid-membrane association at least as strong as that of the PsbP protein of PSII (Figure S1).

## Protection of PSII and PSI against severe dehydration and oxidative stress in the 35S:A9 seedlings

We previously showed that 3-week-old 35S:A9 (T) seedlings survive drastic dehydration; whereas 100% NT siblings die, ≈80% of the T seedlings recover from dehydration treatments (DT) up to  $\Psi \approx -20$  MPa; the root is lost and only leaves and green tissue of the T seedlings survive to different extents after DT up to  $\Psi \approx -40/-50$  MPa. Seedling survival was optimized by performing

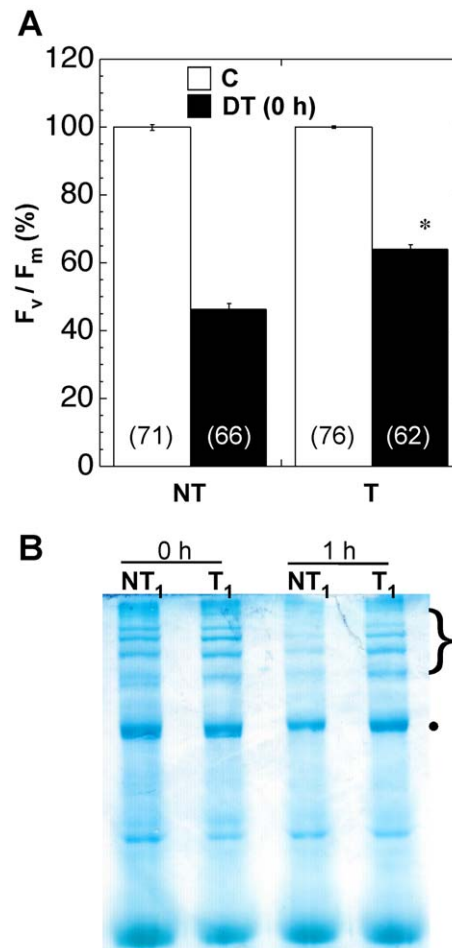


**Figure 1. Effects of gain and loss of function of HaHSFA9 on the accumulation of plastidial sHSPs in seeds and seedlings.** Immunoblot detection with the anti-HSP21 antibody at 1/2,500 dilution. Different transgenic lines (T) were compared with sibling non-transgenic (NT) lines. From top to bottom: DS10:A9 seeds, DS10:A9M3 seeds, and 35S:A9 seedlings. Protein amounts loaded: 25  $\mu$ g total protein for the seed samples and for the 40°C seedling sample; 15  $\mu$ g for the rest of seedling samples. Enhanced detection conditions were used for the DS10:A9M3 samples with respect to DS10:A9 (90 min instead of 5 min exposure, compare the respective NT signals). The high-level accumulation of plastidial sHSPs in unstressed seedlings of the 35S:A9 lines was compared with that in NT seedlings after heat-acclimation for 3 h at 40°C (40°C). Molecular mass markers (kD) are indicated to the left.

doi:10.1371/journal.pone.0051443.g001

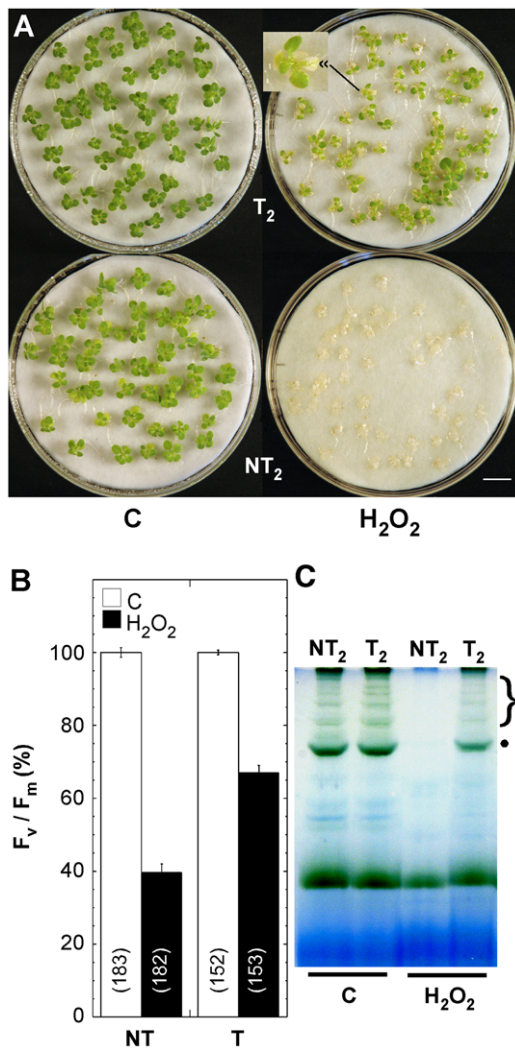
DT in the dark [2]. Here, the described DT2 protocol [2] was modified to allow performing DT using seedlings placed on glass microscope slide during the stress treatment (see “Material and Methods”). Severe dehydration was thus achieved to contents of 0.5–1.0 g water per gram of dry weight (corresponding to  $\Psi \approx -20$  MPa and lower), enabling measurement of  $F_v/F_m$  of PSII immediately after DT (see “Materials and Methods” for details). Figure 2A shows that the maximal efficiency of PSII declined after DT, albeit to levels with respect to the control treatment values that were significantly lower for the NT seedlings compared to T seedlings. These results indicate protection of PSII in seedlings of the 35S:A9 plants. Damage after severe dehydration involves the dismantling of membranes. Dehydration damage also leads to the oxidation of cellular components by ROS (see [16] and references therein). Therefore, we also investigated whether the 35S:A9 seedlings can survive treatments with  $H_2O_2$  in the dark, and if the PSII is indeed protected from oxidative damage. In initial experiments we found that the PSII of T seedlings was protected to different extent after treatments for 24 h with 50 to 500 mM  $H_2O_2$ . Treatment with 200 mM  $H_2O_2$  was selected as the standard experimental condition, because it was the highest  $H_2O_2$  concentration that allowed survival of  $\approx 100\%$  of the T seedlings. The photosynthetic organs –except cotyledons– conserved their green color. In contrast, the NT sibling bleached and did not survive treatments with 200 mM  $H_2O_2$  (see representative results in Figure 3A). In Figure 3B, we also show that immediately after the 200 mM  $H_2O_2$  treatments, the  $F_v/F_m$  values declined to levels with respect to the control treatment values that were significantly lower for the NT than for the T seedlings. The results of Figures 2 and 3 demonstrate protection of vegetative organs and PSII integrity in the 35S:A9 plants.

Thylakoid chlorophyll-protein complexes were also analyzed using Blue-Native gels. These complexes were separated after mild solubilization using  $\beta$ -dodecyl-n-maltoside. We could detect –for example– monomeric PSII, dimeric PSII, and super-complexes with dimeric PSII associated to light-harvesting proteins. These complexes (Figure 2B), which in this gel system are not separated from PSI complexes, were assigned based on comparison of their mobility with those of thylakoid chlorophyll-protein complexes resolved by BN-PAGE reported in the literature (see e.g., [17–19]). Under control conditions, the detected complexes were similar for the NT and T seedlings (Figure 3C). Both the dehydration and  $H_2O_2$  treatments destroyed the plastid membrane complexes in the NT seedlings (Figures 2B and 3C). In contrast, some complexes resisted the stress treatments in the T seedlings. This stress-protection was perhaps more evident for PSII-containing complexes. Notably the protection of PSII super-complexes, which are regarded as the functional photosynthetic units, was higher (Figures 2B and 3C). Interestingly, immediately after DT all complexes apparently resisted dehydration and appeared similar in both NT and T seedlings (Figure 2B, DT samples 0 h). However, following rehydration for only 1 h after DT most NT complexes disappeared, whereas T seedling complexes resisted (Figure 2B, DT samples 1 h). These results contrast with what observed for the  $H_2O_2$  treatments, where protection of the complexes in the T seedlings could be observed immediately after treatment (Figure 3C). Most likely the rapid and drastic dehydration conditions used for DT do not allow the immediate disassembly and degradation of the complexes in the NT seedlings. Indeed, we reported that upon DT2 the water content is reduced below 2.5 g water/g dry weight after only 3 h dehydration [2]. Thus, at least the complexes of PSII in thylakoid membranes of 35S:A9 plants are indeed protected against the oxidative damage imposed by the severe DT and  $H_2O_2$  treatments.



**Figure 2. Protection of PSII from damage caused by severe dehydration.** (A) Comparison of maximum quantum yield ( $F_v/F_m$ ) values of transgenic seedlings (T) with those for the non-transgenic seedlings (NT), determined in control growth conditions (C) and immediately after the dehydration treatment [DT (0 h)]. Average values obtained in 4 to 5 independent experiments performed with two different T/NT line pairs. The difference observed for the DT (0 h) values was statistically significant ( $F = 194.41$ ,  $P = 0.0001$ ) as indicated by the asterisk. Numbers in brackets indicate the different  $F_v/F_m$  determinations performed in each case. (B) Enhanced stability of PSII membrane protein complexes. The complexes were visualized by BN-PAGE using samples prepared from dehydrated seedlings analyzed immediately after the dehydration treatment (0 h), and following rehydration for 1 h (1 h). The gel was stained with colloidal Coomassie blue. Symbols (●, and the bracket on top) mark the dimeric PSII complex and the PSII super-complexes mentioned in the text. Representative results for the T<sub>1</sub>/NT<sub>1</sub> sibling pair are shown.  
doi:10.1371/journal.pone.0051443.g002

Protection of PSII and PSI complexes was further analyzed by immunoblot detection in Blue-Native gels of complexes that incorporate either the D1, or the PsaB protein, respectively (Figure 4). We detected not only the dimeric PSII complexes and PSII super-complexes, but also the partially assembled CV (PSII monomer) and CVII (CP43-less PSII monomer) complexes ([17], see Figure 4A, top). Using anti-PsaB antibodies, the monomeric PSI complex and the PSI-LHCI super-complex were also detected (Figure 4A, bottom). Under control conditions the complexes containing PSII or PSI were similar in samples from the T and NT seedlings. The  $H_2O_2$  treatments destroyed most PSII and PSI complexes of the NT seedlings, and only some monomeric PSI,



**Figure 3. Protection of PSII from damage caused by drastic oxidative stress conditions.** (A) The 35S:A9 seedlings survive drastic oxidative stress conditions. Representative results for the T<sub>2</sub>/NT<sub>2</sub> line pair are shown. Differences in green color were evident between seedlings grown in control conditions (C). Most 35S:A9 seedlings (T<sub>2</sub>) survived treatments for 24 h with 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) that caused complete death of sibling NT<sub>2</sub> seedlings. The 3x-magnified inset shows bleaching of the cotyledons in the surviving T<sub>2</sub> seedlings. Scale bar, 1 cm. (B) Comparison of maximum quantum yield ( $F_v/F_m$ ) of PSII between 35S:A9 (T) and NT seedlings after control (C) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Average values for nine independent experiments performed with three different T/NT line pairs. Statistical difference between the  $F_v/F_m$  values ( $F = 265.58$ ,  $P = 0.0001$ ) and rest of symbols indicated as in Figure 2A. (C) PSII membrane protein complexes of 35S:A9 seedlings partially resisted the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments. Thylakoids from control (C) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treated seedlings (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) were analyzed essentially as indicated in Figure 2B. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> samples were prepared immediately after the treatment and the gel was photographed after BN-PAGE without further staining. Symbols for PSII complexes as in Figure 2B. doi:10.1371/journal.pone.0051443.g003

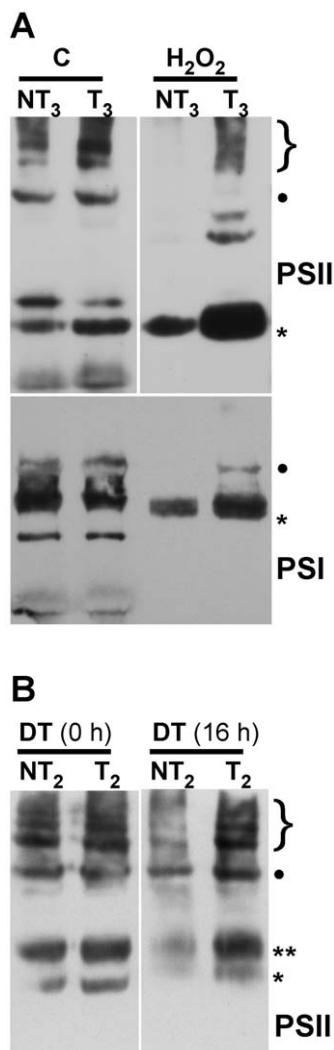
and CVII complexes of PSII persisted (Figure 4A). In contrast in the T seedlings, fully assembled PSII complexes endured the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. In addition, partially assembled D1-containing complexes -in particular the CVII complex- accumulated to higher levels in stressed T than in NT seedlings (Figure 4A, top, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> samples). The PSI-LHCI super-complex also tolerated the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment in the T seedlings (Figure 4A, bottom). Protection of the

D1-containing PSII complexes and super-complexes was confirmed in the T seedlings after treatments of severe dehydration. These complexes persisted in the T and NT seedlings immediately after dehydration [Figure 4B, samples DT (0 h)]. However, 16 h following rehydration after the dehydration treatment, the PSII complexes of T seedlings resisted the treatment better than the NT seedlings. In this case, the CV complex is the partially disassembled D1-containing complex that accumulated to higher level in the T seedlings after the stress treatment [Figure 4B, samples DT (16 h)]. Thus, we confirmed structural protection of the two photosystems.

### Protection of the D1 protein from damage and shielding of PSII repair following oxidative stress and dehydration in the 35S:A9 seedlings. Protection of PSII

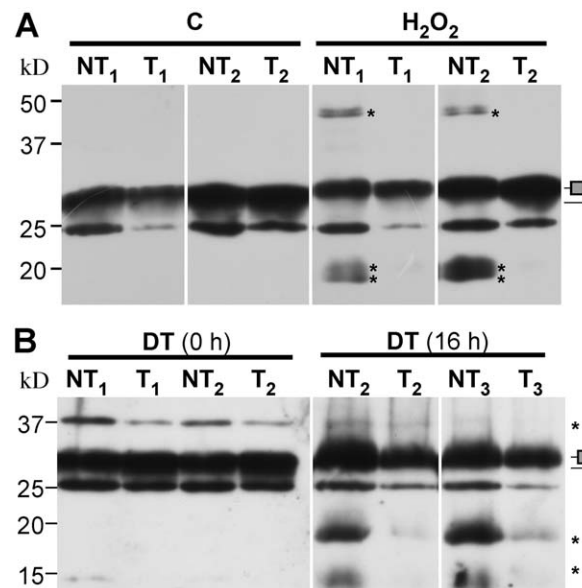
We analyzed if the D1 protein of PSII is protected under the drastic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and dehydration stress conditions used above to study the 35S:A9 seedlings. The preliminary characterization of the seedlings revealed that in our experimental control conditions the T seedlings had higher content of D1 protein than the sibling NT seedlings (Figure S2). In the following analyses, the NT and T protein samples were compared using immunoblots that were normalized attempting to show equal initial (control) levels of the D1 protein signals. To this end, higher amounts of total thylakoid-membrane protein were applied for NT samples. In that way the initial amount of detected D1 protein was similar for each pair of the NT and T samples. This facilitated visual comparison of the abundance of the different D1 forms detected in immunoblot analyses after the stress treatments: e.g., the intact protein, D1-protein adducts, and D1-degradation products. In Figure 5A we show representative results of samples from two pairs of sibling T and NT lines analyzed immediately after 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments performed in the dark. Consistent with the requirement of light for the degradation of the D1 protein, the initial accumulation level of the D1 protein detected in the NT and T samples before treatment did not substantially decrease during the incubation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in darkness. A slight retardation in the mobility of the major D1 band was observed for both the NT and T samples after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments. However, only the NT samples showed bands that migrated above ( $\approx 44.4$  kD) and below ( $\approx 20$  and  $19$  kD) the major D1 band. These bands, which accumulated at low levels in the dark, most likely represent cross-linked adducts of D1 with closely located thylakoid proteins, and initial degradation products of the D1 protein, respectively. The observation for the treated NT samples would thus be similar to previous results describing damage of the D1 protein after *in vitro* exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the dark [20]. In contrast, D1 appears to be protected from oxidative damage in the treated T samples, as no cross-linked D1-bands or degradation products were detected (Figure 5A). In Figure 5B we depict the results of a similar analysis of samples from NT/T lines after severe dehydration (DT) treatment. There, immediately after DT no D1-degradation products were detected; however, the NT samples clearly show higher accumulation of a different D1-crosslinked band of  $\approx 36$  kD (Figure 5B, samples 0 h). Only following rehydration for 16 h after DT additional changes and differences between the NT and T samples were observed (Figure 5B, samples 16 h). These differences were similar to those found as consequences of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments (compare Figures 5A and 5B). The results summarized in Figure 5 clearly show that the D1 protein of the PSII reaction center of the 35S:A9 plants was protected against the oxidative stress that occurs as a result of the severe dehydration and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments *in vivo*.





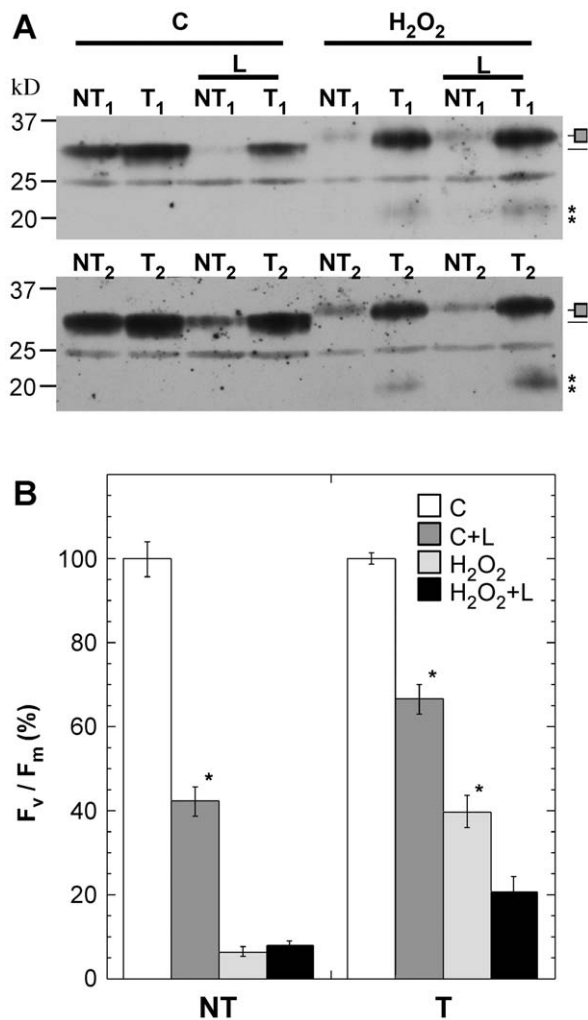
**Figure 4. Membrane protein complexes of PSII and PSI survive in the 35S:A9 seedlings.** (A) Western detection of complexes after the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments. The PSII complexes (top) separated by BN-PAGE were detected using anti-D1 (DE-loop) antibodies at 1/5,000 dilution. The PSI complexes (bottom) were detected using anti-PsaB antibodies at 1/4,000 dilution. PSII symbols: ●, and the bracket on top respectively mark the dimeric PSII complex, and the PSII-LHCII super-complexes. The asterisk marks the CVII (CP43-less PSII monomer) complex. PSI symbols: ● marks the PSI-LHCI super-complex that co-migrates in our gel system with the dimeric PSII complex; the asterisk marks the PSI monomer. (B) The PSII complexes also withstand drastic dehydration. The thylakoid samples were analyzed immediately (0 h) after the dehydration treatment (DT), and following rehydration for 16 h, DT (16 h). In this case the complexes were detected using anti-D1 (C-terminal) antibodies at 1/15,000 dilution. An additional PSII complex mentioned in the text is indicated: CV (\*\*, PSII monomer).  
doi:10.1371/journal.pone.0051443.g004

The synthesis of plastid-encoded components of PSII -as the D1 protein- has been shown to be rapidly inactivated by different forms of stress that cause oxidative damage (see for example [21] and references therein). Because the T seedlings survive DT [2] and drastic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments (Figure 3A) that involve ROS-induced damage, protection and/or reversible inactivation of PSII repair must also occur in the 35S:A9 plants. To test this, we analyzed the effects of lincomycin, a specific inhibitor of plastidial protein synthesis. Following 24 h treatments of seedlings in the



**Figure 5. The D1 protein of PSII is protected from damage caused by oxidative stress and severe dehydration.** (A) Damage by the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) compared to control conditions (C). (B) Protection from damage by the dehydration treatments (DT). The DT samples were analyzed immediately after the dehydration treatment (0 h), and following rehydration for 16 h (16 h). Thylakoid protein samples from the indicated transgenic lines (T) were compared with sibling non-transgenic (NT) lines. Protein amounts loaded per lane in order to obtain similar initial amounts of the D1 protein: NT<sub>1</sub> (40 µg), T<sub>1</sub> (10 µg), NT<sub>2</sub> (20 µg), T<sub>2</sub> (10 µg), NT<sub>3</sub> (20 µg), and T<sub>3</sub> (10 µg). Immunoblot detection was performed with anti-D1 (DE-loop) antibodies at 1/2,000 (A) or 1/6,000 dilution (B). To the right of each panel, a thin line marks the position of the major D1 band; slightly above, a shaded square marks the retarded mobility D1 band observed after the stress treatments. Asterisks above and below the major D1 bands respectively indicate the cross-linked and degraded D1 protein bands mentioned in the text. Molecular mass markers (kD) are indicated to the left.  
doi:10.1371/journal.pone.0051443.g005

dark in the absence or presence of 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the control and the stressed seedlings were transferred to normal illumination conditions for 6 h with or without the addition of lincomycin. In Figure 6A we depict the effect of lincomycin on D1 protein accumulation (the initial NT/T D1 protein levels were normalized as in Figure 5). Apparently under control conditions, normal illumination in the presence of the inhibitor can damage the D1 protein. Thus, the D1 protein of control NT seedlings showed a net degradation only in the presence of lincomycin (Figure 6A, C samples). This damage is clearly much lower in the control T seedlings, which showed higher levels of D1 protein in the presence of lincomycin. Therefore, we infer that protection of the D1 protein in T seedlings delays D1 degradation compared to NT seedlings even under control conditions. After H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress conditions protection and delayed degradation of the D1 protein in the T seedlings was even more evident; furthermore, it occurred to the same extent both in the absence and presence of lincomycin (Figure 6A, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> samples). The accumulation level of the D1 protein in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated T seedlings was very similar to that of control T seedlings. In contrast, we observed substantial degradation of the D1 protein in the NT seedlings after exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress conditions, as demonstrated by a drastic reduction of D1 accumulation levels. That reduction also occurred both with and without the lincomycin treatment. We thus confirmed protection and delayed degradation of D1 in the stressed T



**Figure 6. Delayed degradation of the D1 protein and protection of the D1 protein synthesis in the 35S:A9 seedlings.** (A) Accumulation of the D1 protein under control growth conditions (C) and after treatments with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). In each case the seedlings were exposed to 6 h normal light conditions in absence or in presence of 1mM lincomycin (L). Sample labels and rest of symbols as in Figure 5A. Protein amounts loaded per lane as in Figure 5. (B) Comparison of maximum quantum yield ( $F_v/F_m$ ) of PSII between 35S:A9 seedlings (T) and sibling NT seedlings in the experimental conditions used in (A). We show average values from a representative experiment performed with three different T/NT line pairs ( $n=18$ , for all conditions). Asterisks indicate the significant statistical differences found between the  $F_v/F_m$  values obtained in absence and presence of lincomycin: for control NT seedlings ( $F=111.6$ ,  $P=0.0001$ ); for control T seedlings, ( $F=59.21$ ,  $P=0.0001$ ); and for stressed T seedlings ( $F=37.75$ ,  $P=0.0001$ ). doi:10.1371/journal.pone.0051443.g006

seedlings. That lincomycin treatment did not have an additional effect on D1 accumulation after the stress treatments would fit the expected, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced, inhibition of the protein synthesis [21] that is involved in replacement of the damaged D1 protein.

The exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may inhibit the synthesis of the D1 protein in the NT seedlings to a similar extent as with the lincomycin treatment. To support this notion, the seedlings used for the protein analyses of Figure 6A were characterized in parallel for the indirect effects of lincomycin on the maximal quantum efficiency of PSII (Figure 6B). Lincomycin treatment significantly reduced the  $F_v/F_m$  values of control NT seedlings, and a similar

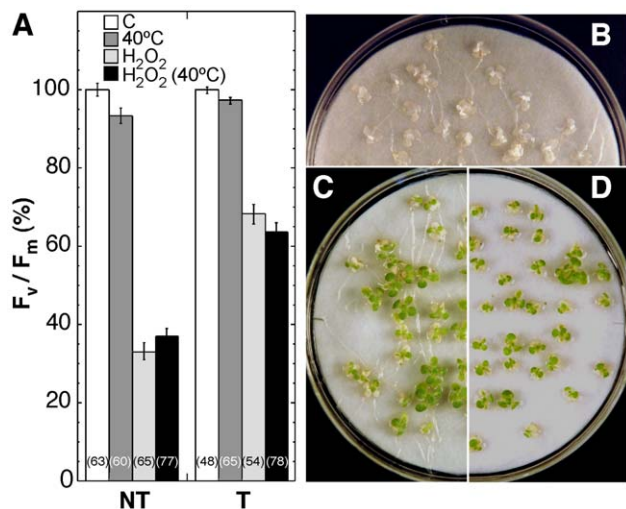
reduction, although lower, was also significant for control T seedlings (Figure 6B, compare C and C+L values). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment of the NT seedlings drastically decreased the  $F_v/F_m$  values to very low levels. In contrast, the stressed T seedlings showed significantly higher  $F_v/F_m$  values. These results confirm protection of PSII in the T seedlings, both under control and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress conditions. Lincomycin treatment did not further decrease the marginal  $F_v/F_m$  value observed for the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated NT seedlings. However, for the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated T seedlings a significant decrease of  $F_v/F_m$  was observed upon lincomycin treatment (Figure 6B, compare H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>+L values). This result would indicate both the protection from oxidative stress and the partial recovery of the plastidial protein synthesis involved in the repair of PSII in the 35S:A9 plants. In contrast, the PSII and the plastidial protein synthesis of the sibling NT plants would be irreversibly damaged, which contributes to the observed eventual death of these seedlings (see Figure 3A). In Figure S3, we present similar results using 35S:A9 plants subjected to DT. An indication of the recovery of plastidial protein synthesis was also observed only for the T plants. Sixteen hours after DT lincomycin significantly further reduced the  $F_v/F_m$  values (Figure S3, difference indicated by the asterisk,  $F=103.6$ ,  $P=0.0001$ ). Thus, the recovery after DT appears to be delayed in comparison to what occurs after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress.

The effects of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments on the accumulation of the PSI core protein PsaB were also analyzed. Using the same control and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated samples as in Figure 6A (the samples without subsequent treatment with lincomycin), complete degradation of PsaB in the NT seedlings was observed. In contrast, PsaB was still detected in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated T seedlings (Figure S4). Protection of the PsaB protein thus further confirmed the structural protection of PSI observed in these seedlings (Figure 4A, bottom).

### The heat-acclimation response does not confer resistance to the drastic oxidative stress conditions tolerated by the 35S:A9 seedlings

The HSFA9 program includes the seed expression of genes that encode HSPs of different kinds. Some of these HSPs also accumulated in seedlings in response to the sub-lethal heat stress acclimation conditions (3 h at 40°C) used to induce acquired thermo-tolerance [2]. It was previously shown [2] that heat-acclimated NT seedlings withstand treatments of 2.5 h at 50°C but are killed by the severe dehydration conditions (the DT2 treatments). In contrast, sibling T (35S:A9) seedlings withstand DT2 but are killed by the 50°C treatment unless previously heat-acclimated [2]. Here it was investigated if the same observation applies to resistance to the unusually high levels of oxidative stress imposed by the harsh H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments used in this study (Figure 7). The effects of the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments as in Figure 3B (compare the C and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> samples) were analyzed using also seedlings that were first heat-acclimated during 3 h at 40°C [2]. Heat-acclimation did not prevent the decrease of  $F_v/F_m$  in the stressed NT seedlings; neither did it enhance the protection observed in the stressed T seedlings (Figure 7A). The heat-acclimated NT seedlings did not survive treatments for 24 h with 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the dark (Figure 7B). In addition, the heat-acclimated T seedlings survived these treatments to the same extent as observed with non-acclimated T seedlings (Figures 7C and 7D). The genetic program(s) activated in vegetative organs by heat are thus insufficient for conferring resistance to the oxidative stress conditions used in the present study. Such conditions, however, are tolerated by the 35S:A9 seedlings, which overexpress the seed HSFA9 program.





**Figure 7. Heat acclimation does not protect PSII from damage caused by the drastic oxidative stress conditions.** (A) Maximum quantum yield ( $F_v/F_m$ ) of PSII for 35S:A9 seedlings (T) compared to sibling NT seedlings. The effects of standard  $H_2O_2$  treatments were analyzed as in Figure 3B (compare the C and  $H_2O_2$  samples), and using seedlings that were first heat-acclimated during 3 h at 40°C. The corresponding control and  $H_2O_2$ -treated samples are labeled 40°C and  $H_2O_2$  (40°C), respectively. The average values for three to four experiments performed with three different T/NT line pairs are shown. Numbers in brackets indicate the different  $F_v/F_m$  determinations performed in each case. Heat-acclimation did not induce significant differences in  $F_v/F_m$  after  $H_2O_2$  treatments in NT ( $F = 1.94$ ,  $P = 0.16$ ) or T ( $F = 3.32$ ,  $P = 0.07$ ) seedlings. (B) The heat-acclimated NT seedlings did not survive the  $H_2O_2$  treatments. (C) Survival of non-acclimated T seedlings. (D) Survival of heat-acclimated T seedlings. doi:10.1371/journal.pone.0051443.g007

## Discussion

The ectopic activation of the HSFA9 program in vegetative tissues of transgenic tobacco led to phenotypes of tolerance to drastic dehydration [2]. Here, we found that these phenotypes include tolerance to very severe oxidative stress and protection of the photosynthetic apparatus (Figures 2, 3, 4, 5, 6, 7). The HSFA9 program is seed-specific and thus our results suggest that such program is involved in the protection of seed non-photosynthetic plastids and proplastids, since these and other organelles must survive developmental desiccation.

The HSFA9 program conferred protection against severe dehydration and oxidative damage of photosynthetic membranes, PSII and core components of PSII as the D1 protein, as well as protection of PSI and its core protein PsbA. The protection appears to occur at different structural levels. We observed that both the D1 protein and its plastidial synthesis were resistant to damage (Figures 5 and 6). The integrity of supra-molecular membrane-protein complexes was also preserved to some extent; for example that of super-complexes with dimeric PSII, or PSI-LHCI (Figures 2B, 3C and 4). The *de novo* synthesis required for replacement of damaged proteins in the reaction center of PSII—in particular that of the D1 protein—affects the stability of PSII complexes in thylakoids; such complexes collapse under different experimental conditions where the synthesis is blocked (reviewed in [15,22]). This suggests that the protection of the D1 protein and its plastidial synthesis might contribute to explaining the observed higher stability of PSII-containing complexes and super-complexes in the stressed 35S:A9 plants. In fact, we get converse effects on PSII as compared to mutants where a decreased stability of the

PSII complexes was observed in coincidence with lower D1 protein accumulation/stability and lower D1-synthesis rates than in the WT. This includes mutants lacking PAM68 [18], or LQY1 [23]. Both PAM68 and LQY1 are thylakoid-associated proteins that would be involved in PSII-complex assembly by enhancing the turnover and biogenesis of the D1 protein. Therefore, the protection of other thylakoid-associated proteins, such as assembly factors, might also be required to explain the complex stress resistance phenotypes of the 35S:A9 seedlings. In conclusion, protection against oxidative damage of the D1 protein and that of its repair synthesis in the plastid could in part explain the drastic resistance to dehydration of PSII complexes in the 35S:A9 seedlings. It is worth noting that in some resurrection plants, but not in normal plants, the PsbA and D1 proteins, as well as PSI and PSII complexes, appeared to be similarly protected from dark dehydration treatments similar to those used here (e.g., [12,13]). In these homoiochlorophyllous resurrection plants, which do not dismantle photosynthetic membranes when desiccated, this protection involves limiting the structural damage to levels that are reversible (reviewed in [16]). That would be similar to what we observed in Figures 2B, 3C and 4. The severe oxidative/dehydration stress conditions used in this work would irreversibly damage not only PSII but also PSI in the NT seedlings, which do not survive the stress treatments. PSI function in vegetative tissues strictly depends on protection mechanisms that are still not well characterized. These mechanisms would suffice to cope only with normal stress levels in most plants [11]. The severe stress conditions used here would overcome the normal protection of PSI/PSII. Only the activation of seed-specific protection mechanism(s) in the 35S:A9 seedlings would allow subsistence (PSI/PSII) and repair (PSII) of the photosystems and survival of the plantlets. In resurrection plants, genetic programs that are seed-specific in normal plants operate in vegetative organs; thus, the photosynthetic machinery would be protected from drastic dehydration in a similar way as proposed here [16].

We previously discussed the dehydration levels tolerated by whole 35S:A9 seedlings and by vegetative organs, such as leaves, in comparison to seeds, resurrection plants and mosses [2]. What was achieved in these seedlings is not a “canonical” desiccation tolerance as found in resurrection plants and seeds. However, the tolerated dehydration in 35S:A9 green organs is still far beyond what has been reported in any other study of non-resurrection plants. This includes genetic attempts to enhance their native tolerance (see [2] and references therein). The results presented in Figure 7 revealed that the oxidative stress conditions used in this report are as harsh as the drastic dehydration treatments (Figure 2 and [2]). Indeed, the  $H_2O_2$  treatments damaged components of PSII, and even of PSI, which is considered to be resistant at least to moderate levels of stress [11]. Resistance to either very severe dehydration, or to the drastic oxidative stress conditions used in this report, was not observed after standard heat acclimation treatments (Figure 7). These acclimation treatments [2] induce a complex genetic response that in vegetative organs suffices only for coping with moderate levels of stress. In contrast, the unusual stress tolerance reported here required the activation of the seed HSFA9 program in vegetative organs of the 35S:A9 seedlings (Figure 7). Comparisons of the patterns of HSP and sHSP accumulation indicate that a partial overlap of common target genes exists between the HSFA9 program and the programs of vegetative heat-acclimation ([2]; Figure 1). We previously reasoned that the unusual dehydration-stress resistance of the 35S:A9 seedlings is explained by expression at normal growth of seed genes (HSFA9 targets) that differ from those activated by heat acclimation [2]. The present study extends that proposal. Here, we

infer that only the specific target genes of the HSFA9 program can induce resistance of the photosynthetic machinery to both the severe dehydration, and to the drastic oxidative stress conditions used in our studies. The results in the present study also point to further differences in gene expression that involve plastidial sHSPs (as presented in Figure 1). Thus, the ectopic expression of different seed HSPs, including plastidial sHSPs, correlated with the observed protection in seedlings. However, we believe that it is unlikely that any single gene activated by HaHSFA9 suffices for this protection. The anti-oxidant functions demonstrated for plastidial sHSPs of higher plants [7–9,24] might in part explain the observed protection of the D1 protein from oxidative damage. Thus, the 35S-driven overexpression of Arabidopsis HSP21 generated a higher abundance of the plastidial protein in unstressed leaves than induced by heat acclimation temperatures [25]. This is similar to what we observe for the HSP21-like polypeptides induced by HaHSFA9 in Figure 1 (bottom). The overexpression of HSP21 has been reported to only confer very moderate protection from oxidative damage under combined heat and high-light stress. Only subtle differences between the  $F_v/F_m$  of transgenic and NT plants were observed [24]. Therefore, the overexpression of a single plastidial sHSP would not be sufficient for explaining the complex protection to extreme stress conditions that the 35S:A9 seedlings show. The association of different sHSPs with membranes has been found to decrease their fluidity, and in some cases to enhance thylakoid stability. The latter includes results obtained for sHSPs from cyanobacteria that are similar to sHSPs CI (reviewed in [26]). In summary, seed sHSPs that include plastidial sHSPs could be in part responsible for the complex protection effects observed. Any other potential target gene of HSFA9 that is involved in the protection effects reported in the present study would also not be part of the vegetative programs of thermo-tolerance.

In conclusion, the seed HSFA9 program conferred protection of photosynthetic membranes in seedlings, from damage caused *in vivo* by very harsh dehydration and oxidation. We identified some of the protected components in the two photosystems. Protection of the photosynthetic apparatus from the extreme stress conditions used in this report would be unprecedented for normal plants. The results presented here might facilitate the future engineering of stress-tolerant photosynthetic membranes, green organs, and even whole plants.

## Materials and Methods

### Plant growth conditions and stress treatments

The tobacco (*N. tabacum* L. var. Xanthi) T and NT seedlings, aged 3–4 weeks (with two pairs of true leaves), were grown on filter paper placed on Petri dishes with solid MS medium, as described [2].

In the modified dehydration treatment (DT) protocol, 3 to 4 T seedlings were placed on a glass 76×26 mm microscope slide, and the same number of the corresponding NT seedlings on a second slide. Both slides were placed alongside within the same closed glass container with 5 g silica gel and allowed to dry in the dark for 3–4 h, essentially as described for the DT2 assays [2]. This new protocol allowed using the dehydrated seedlings for immediate measurement of PSII fluorescence as described below.

For oxidative stress treatments, the filter paper with the seedlings (c.a., 60 per dish at a time) was removed and pre-washed in the solution used for the subsequent treatment: deionized water (for controls), or  $H_2O_2$  (200 mM for the standard stress treatment). The  $H_2O_2$  solution was prepared by diluting in deionized water the 30% w/w (8.82 M)  $H_2O_2$  stock (Sigma

#H1009). The final concentration was verified by measuring  $A_{240}$  ( $A_{240} = 1.31$  for 30 mM  $H_2O_2$ ). These solutions also included 0.1% Tween–20 to facilitate seedling penetration. After removing the excess of liquid, the seedlings were put back inside Petri dishes; the seedlings placed on 6 circles of filter paper wetted with the respective treatment solution. The Petri dishes were incubated at 20–25°C in the dark for 24 h. After the treatment, the seedlings were washed with deionized water. When the stress treatment was followed by a treatment with lincomycin, the seedlings were washed in 1 mM lincomycin and placed on filter paper soaked with 1 mM lincomycin within sealed Petri dishes; the seedlings were first left for 1 h in the dark to allow lincomycin penetration, and then put under normal light conditions (daylight lamps, ≈6,000 lux) for 6 h. For assaying survival of seedlings after the  $H_2O_2$  treatment and washing with deionized water, the seedlings were placed again on wet filter paper within sealed Petri dishes. The seedlings were photographed after 1 week inside growth-cabinets with photoperiod.

### Chlorophyll fluorescence

Chlorophyll fluorescence was measured with a mini-PAM Photosynthesis Yield Analyzer (Heinz Walz, Effeltrich, Germany). Immediately after the stress (or respective control) treatments, each seedling was placed between glass microscope slides (76×26 mm, bottom, and 60×24 mm, cover); the slides were fastened using DLC-8 clips. After a subsequent dark adaptation period of 25 min, minimum fluorescence ( $F_o$ ) was determined by a weak red light. Maximum fluorescence of dark-adapted state ( $F_m$ ) was measured during a subsequent saturating light pulse (14,000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  for 0.8 s). The maximal quantum efficiency of PSII ( $F_v/F_m$ ) was determined as the ratio of variable fluorescence ( $F_v$ ) to  $F_m$ . Measurements for six different seedlings per condition (e.g., control or stress treatment) were averaged in each independent experiment.  $F_v/F_m$  values after the different stress treatments are represented as percent values of the respective control  $F_v/F_m$  values. The seedlings were chosen to represent different locations within the Petri dish. The number of experimental repeats is indicated in the Figure legends.

### Isolation of thylakoid membranes

Thylakoid membranes were prepared essentially as described [27]. Whole-seedling material was frozen and reduced to a fine powder using liquid  $N_2$  in a cooled mortar; then it was homogenized under weak ambient light in ice-cold isolation buffer (330 mM sucrose, 25 mM HEPES-KOH, pH 7.4, 10 mM  $MgCl_2$ , and 10 mM NaF) supplemented with 1 mM Pefablock (Roche). Approximately 1 mL of buffer was used per 200 mg of seedling powder. Extracts were collected after filtration through Miracloth (Calbiochem). The filtrate was then centrifuged at 4°C for 5 min at 6,000g; pellets with the membranes were gently re-suspended in isolation buffer without sucrose, and washed in this buffer by centrifugation and re-suspension in the same conditions. The washed thylakoid membranes were re-suspended in Pefablock-supplemented isolation buffer (using 1  $\mu\text{L}$  buffer per mg of starting frozen material), and stored at –80°C in aliquots of ≈50  $\mu\text{L}$ . The protein content of the thylakoid membranes was quantified using the modification of the Lowry procedure by Markwell *et al.* [28].

### Protein analyses

The procedures for the analyses performed with seedling total protein extracts were as described [1,2]. 1D-PAGE with thylakoid protein extracts was performed similarly, only that the 12.5% polyacrylamide gels and sample buffer contained 4 M Urea. Immunoblot procedures using PVDF membranes were essentially

as described [1,2]. The following primary antibodies -obtained from Agrisera, Sweden- were used in this study, at dilutions indicated in each case in the corresponding Figures: Arabidopsis HSP21 (AS08285); D1 protein (PsbA, anti-C-terminal and anti-DE-loop, respectively AS05084, AS10704); PsbB (AS10695).

## BN-PAGE

1D-BN-PAGE was performed as described [29] with slight modifications. Samples of washed thylakoids (100 µg total protein) were re-suspended in 10 µL 20% (w/v) glycerol, 25 mM BisTris-HCl, pH 7.0. An equal volume of re-suspension buffer containing 2% β-dodecyl-maltoside was gently mixed within a micro-pipet tip. Samples then were incubated for 30 min at 4°C, the insoluble material removed by centrifugation; the solubilized material was combined with Serva-Blue G and loaded into 0.75-mm-thick 5–13.5% acrylamide gradient gels [29]. These gels were run for 4–5 h at constant voltage (150 V) at 4–8°C. The cathode buffer was exchanged with buffer lacking dye after 2 h electrophoresis; the electrophoresis was stopped when most of the front-moving dye exited the gel. BN-Gels were then directly photographed, stained with colloidal Coomassie Brilliant Blue G-250 [30], or transferred to PVDF membranes. The immunoblot analyses after BN-PAGE differ from those previously described [1,2] in that: 1.– Blocking with TBST was prolonged overnight to facilitate removal of the bound Serva-Blue G dye from the membrane. 2.– Hybridization with the primary antibodies was for 4 h at 25°C.

## Statistical analyses

Differences between T and NT groups of sibling seedlings were tested by analysis of variance (ANOVA). The statistical analyses were performed as described in detail [1,2].

## Supporting Information

**Figure S1. The HSP21-like polypeptides in the 35S:A9 seedlings associate with thylakoid membranes at normal growth temperatures.** (A) Washing of thylakoid membranes removes contamination from stromal HSP70B. Comparison of signals obtained for total protein extracted from seedlings (Tot) and from pellets (P) of thylakoid preparations that were washed once (W1) or four times (W4). The amounts of loaded protein corresponded to an equivalent amount of chlorophyll: 2 µg in all lanes. Antibodies against the Arabidopsis HSP70B protein (Agrisera AS08348) were used at 1/8,000 dilution. (B) Comparison of the HSP21 and PsbP proteins in pellet (P) and soluble (S) fractions after treatments with 1 M NaCl or 0.8 M Tris-HCl, pH 8.4, for 60 min at 25°C, followed by centrifugation for 20 min at 16,000 g and 4°C. Protein amounts in each fraction

were compared with the initial total amounts in thylakoid pellets that were washed four times (W4/P). These amounts correspond to 0.5 µg (sHSP-P detection), or 0.2 µg of chlorophyll (PsbP detection). Antibodies against HSP21 or PsbP (Agrisera AS06167) were both used at 1/3,000 dilution.

(TIF)

**Figure S2. Enhanced accumulation of the D1 protein in thylakoid membranes of the 35S:A9 seedlings.** The 3 pairs of T/NT sibling lines were compared. Sample amounts of thylakoid protein loaded: 0.15 µg for D1 detection in all lanes. Equal loading was verified with Ponceau S staining (Po) using a higher amount thylakoid protein from the same samples: 20 µg. Antibodies against the C-terminal region of the D1 protein were used at 1/15,000 dilution. Molecular mass markers (kD) are indicated.

(TIF)

**Figure S3. Protection of plastidial protein synthesis in the dehydrated 35S:A9 seedlings.** Maximum quantum yield ( $F_v/F_m$ ) of PSII for 35S:A9 seedlings (T) compared to sibling NT seedlings. The effect of 1 mM lincomycin (L) was analyzed. Lincomycin was added during 16 h of rehydration under normal light conditions (R) of seedlings subjected first to dehydration treatments [DT (R)]: compare DT (R) with DT (R)+L. The  $F_v/F_m$  values obtained immediately after dehydration are also indicated (DT). We show average values from three independent experiments performed with two different T/NT line pairs. Numbers in brackets indicate the total number of  $F_v/F_m$  determinations in each condition.

(TIF)

**Figure S4. The PsbB protein of PSI is protected from damage caused by oxidative stress in the 35S:A9 seedlings.** The same protein samples from experiments analyzed in Figure 7A for D1 protection were used here. Immunoblot detection was performed using anti-PsbB antibodies at 1/5,000 dilution. Sample labels are described in the legend of Figure 7A.

(TIF)

## Acknowledgments

We thank Francisco Javier Durán for his technical assistance in the preparation of seedling material.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JJ CA ML. Performed the experiments: CA PPD JMP JTC JJ. Analyzed the data: JJ PPD ML ADE. Contributed reagents/materials/analysis tools: ADE. Wrote the paper: JJ.

## References

- Prieto-Dapena P, Castaño R, Almoguera C, Jordano J (2006) Improved resistance to controlled deterioration in transgenic seeds. *Plant Physiol* 142: 1102–1112.
- Prieto-Dapena P, Castaño R, Almoguera C, Jordano J (2008) The ectopic overexpression of a seed-specific transcription factor, HaHSFA9, confers tolerance to severe dehydration in vegetative organs. *Plant J* 54: 1004–1014.
- Tejedor-Cano J, Prieto-Dapena P, Almoguera C, Carranco R, Hiratsu K, et al. (2010) Loss of function of the HSF9 seed longevity program. *Plant Cell Environ* 33: 1408–1417.
- Sugliani M, Rajjou L, Clerckx EJM, Koornneef M, Soppe WJJ (2009) Natural modifiers of seed longevity in the Arabidopsis mutants *abscisic acid insensitive3–5 (abi3–5)* and *leafy cotyledon1–3 (lec1–3)*. *New Phytol* 184: 898–908.
- Almoguera C, Rojas A, Diaz-Martin J, Prieto-Dapena P, Carranco R, et al. (2002) A seed-specific heat-shock transcription factor involved in developmental regulation during embryogenesis in sunflower. *J Biol Chem* 277: 43866–43872.
- Kotak S, Vierling E, Baumlein H, Koskull-Döring P (2007) A Novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress proteins during seed development of Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 182–195.
- Barua D, Downs CA, Heckathorn SA (2003) Variation in chloroplast small heat-shock protein function is a major determinant of variation in thermotolerance of photosynthetic electron transport among ecotypes of *Chenopodium album*. *Funct Plant Biol* 30: 1071–1079.
- Neta-Sharir I, Isaacson T, Lurie S, Weiss D (2005) Dual role for tomato heat shock protein 21: Protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation. *Plant Cell* 17: 1829–1838.
- Guo SJ, Zhou HY, Zhang XS, Li XG, Meng QW (2007) Overexpression of *CaHSP26* in transgenic tobacco alleviates photoinhibition of PSII and PSI during chilling stress under low irradiance. *J Plant Physiol* 164: 126–136.
- Allakhverdiev SI, Kreslavski VD, Klimov VV, Los DA, Carpentier R, et al. (2008) Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynth Res* 98: 541–550.
- Sonoike K (2011) Photoinhibition of photosystem I. *Physiol Plant* 142: 56–64.
- Deng X, Hu ZA, Wang HX, Wen XG, Kuang TY (2003) A comparison of photosynthetic apparatus of the detached leaves of the resurrection plant *Boea hygrometrica* with its non-tolerant relative *Chirita heterotrichia* in response to dehydration and rehydration. *Plant Sci* 165: 851–861.

13. Georgieva K, Röding A, Büchel C (2009) Changes in some thylakoid membrane proteins and pigments upon desiccation of the resurrection plant *Habelea rhodopensis*. *J Plant Physiol* 166: 1520–1528.
14. Aro EM, Virgin I, Andersson B (1993) Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta* 1143: 113–134.
15. Nixon PJ, Michoux F, Yu J, Boehm M, Komenda J (2010) Recent advances in understanding the assembly and repair of photosystem II. *Ann Bot (London)* 106: 1–16.
16. Dinakar C, Djilianov D, Bartels D (2012) Photosynthesis in desiccation tolerant plants: Energy metabolism and antioxidative stress defense. *Plant Sci* 182: 29–41.
17. Lundin B, Nurmi M, Rojas-Stuetz M, Aro EM, Adamska I, et al. (2008) Towards understanding the functional difference between the two PsbO isoforms in *Arabidopsis thaliana*—insights from phenotypic analyses of *psbo* knockout mutants. *Photosynth Res* 98: 405–414.
18. Armbruster U, Zuhlke J, Rengstl B, Kreller R, Makarenko E, et al. (2010) The *Arabidopsis* thylakoid protein PAM68 is required for efficient D1 biogenesis and photosystem II assembly. *Plant Cell* 22: 3439–3460.
19. García-Cerdán JG, Kovács L, Tóth T, Kereiche S, Aseeva E, et al. (2011) The PsbW protein stabilizes the supramolecular organization of photosystem II in higher plants. *Plant J* 65: 368–381.
20. Miyao M, Ikeuchi M, Yamamoto N, Ono T (1995) Specific degradation of the D1 protein of photosystem II by treatment with hydrogen peroxide in darkness: implications for the mechanism of degradation of the D1 protein under illumination. *Biochemistry* 34: 10019–10026.
21. Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Murata N (2011) Protein synthesis is the primary target of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Physiol Plant* 142: 35–46.
22. Aro EM, Suorsa M, Rokka A, Allahverdiyeva Y, Paakkari V, et al. (2005) Dynamics of photosystem II: a proteomic approach to thylakoid protein complexes. *J Exp Bot* 56: 347–356.
23. Lu Y, Hall DA, Last RL (2011) A small zinc finger thylakoid protein plays a role in maintenance of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23: 1861–1875.
24. Hårdahl U, Hall RB, Osteryoung KW, Vierling E, Bornman JF, et al. (1999) The chloroplast small heat shock protein undergoes oxidation-dependent conformational changes and may protect plants from oxidative stress. *Cell Stress Chaperones* 4: 129–138.
25. Osteryoung KW, Vierling E (1992) Genetic approaches to the function of the chloroplast low molecular weight heat shock protein. In: Murata N, editor. *Research in Photosynthesis*. Kluwer Academic Publisher, Vol IV, 129–136.
26. Nakamoto H, Vigh L (2007) The small heat shock proteins and their clients. *Cell Mol Life Sci* 64: 294–306.
27. Lepistö A, Kangasjärvi S, Luomala EM, Brader G, Sipari N, et al. (2009) Chloroplast NADPH-thioredoxin reductase interacts with photoperiodic development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 149: 1261–1276.
28. Markwell MA, Haas SM, Bieber LL, Tolbert NE (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* 87: 206–210.
29. Cline K, Mori H (2001) Thylakoid DeltapH-dependent precursor proteins bind to a cpTatC-Hcf106 complex before Tha4-dependent transport. *J Cell Biol* 154: 719–729.
30. Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9: 255–262.

# A Passive Repression Mechanism that Hinders Synergic Transcriptional Activation by Heat Shock Factors Involved in Sunflower Seed Longevity

Dear Editor,

Different genetic programs that are active during late stages of zygotic embryogenesis are involved in seed phenotypes as longevity, basal thermotolerance, and desiccation tolerance. In sunflower, Heat Shock Factor A9 (HaHSFA9) controls one of such programs: the HaHSFA9 program. Overexpression of HaHSFA9 in seeds of transgenic tobacco showed the involvement of this transcription factor in basal thermotolerance and longevity; HaHSFA9 activated a genetic program that includes specific small Heat Shock Protein (*sHSP*) genes, which are expressed mainly (or exclusively) during zygotic embryogenesis in seeds (Prieto-Dapena et al., 2006). We also used an active-repressor dominant-negative (DN) form of HaHSFA9, and thus we obtained a substantial reduction of both the accumulation of specific *sHSP*s and of seed longevity (Tejedor-Cano et al., 2010). In contrast, transcription-inactive DN forms were inefficient. We therefore inferred the participation of additional HSF(s) in controlling the genetic program activated by HaHSFA9, rather than involvement of a single master control HSF (i.e. HaHSFA9 only). These additional HSF(s) would belong to class A, as HaHSFA9 (Tejedor-Cano et al., 2010). Furthermore, we obtained a similar reduction of seed longevity upon the overexpression of stabilized forms of HaIAA27, an Aux/IAA protein that represses HaHSFA9 in sunflower embryos. That observation connected plant seed longevity with auxin hormone action and led us to predicting that the additional HSF(s) involved in the activation of the HaHSFA9 program should be also repressed by HaIAA27 (Carranco et al., 2010). Here, we identify HaHSFA4a as one of these additional HSFs. We demonstrate a transcriptional synergism between HaHSFA4a and HaHSFA9. Furthermore, we provide evidence for a novel, passive repression mechanism of this synergism by HaIAA27.

We used an immature-embryo sunflower cDNA library, and a yeast two-hybrid strategy using an inactive form of HaHSFA9 as the bait, to clone a HSF expressed in immature seeds. The cloned HSF was named HaHSFA4a, as it clearly belongs to the A4a group of plant HSFs (Scharf et al., 2012). The complete protein encoded by the HaHSFA4a cDNA (Supplemental Figure 1) could substitute the yeast sole HSF in functional complementation assays. In addition, a GAL4<sub>DBD</sub>–HaHSFA4a fusion protein activated transcription in yeast one-hybrid experiments (Supplemental Figure 2). Thus, HaHSFA4a is a transcriptional activator HSF that is functional in yeast.

We determined the domains of HaHSFA9 involved in two-hybrid interaction with HaHSFA4a. The oligomerization

domain (OD) appears to be important; neither the DNA binding domain nor the C-terminal activation domain of HaHSFA9 is required for two-hybrid interaction (Supplemental Figure 3). We also confirmed *in vitro* a direct physical interaction between HaHSFA9 and HaHSFA4a by means of GST pull-down (Supplemental Figure 4). Using BiFC assays, we found that the interaction between HaHSFA4a and HaHSFA9 indeed occurs in plant nuclei (Figure 1H and Supplemental Figure 4). This result indicates that HaHSFA4a might help HaHSFA9 in the transcriptional activation of *sHSP* gene promoters in the HSFA9 seed genetic program. The results in Figure 1F and 1J show that HaHSFA9 and HaHSFA4a synergistically activate the *Hahsp17.7* G4 (G4) promoter in bombarded sunflower embryos and leaves (statistical analyses in Supplemental Table 1).

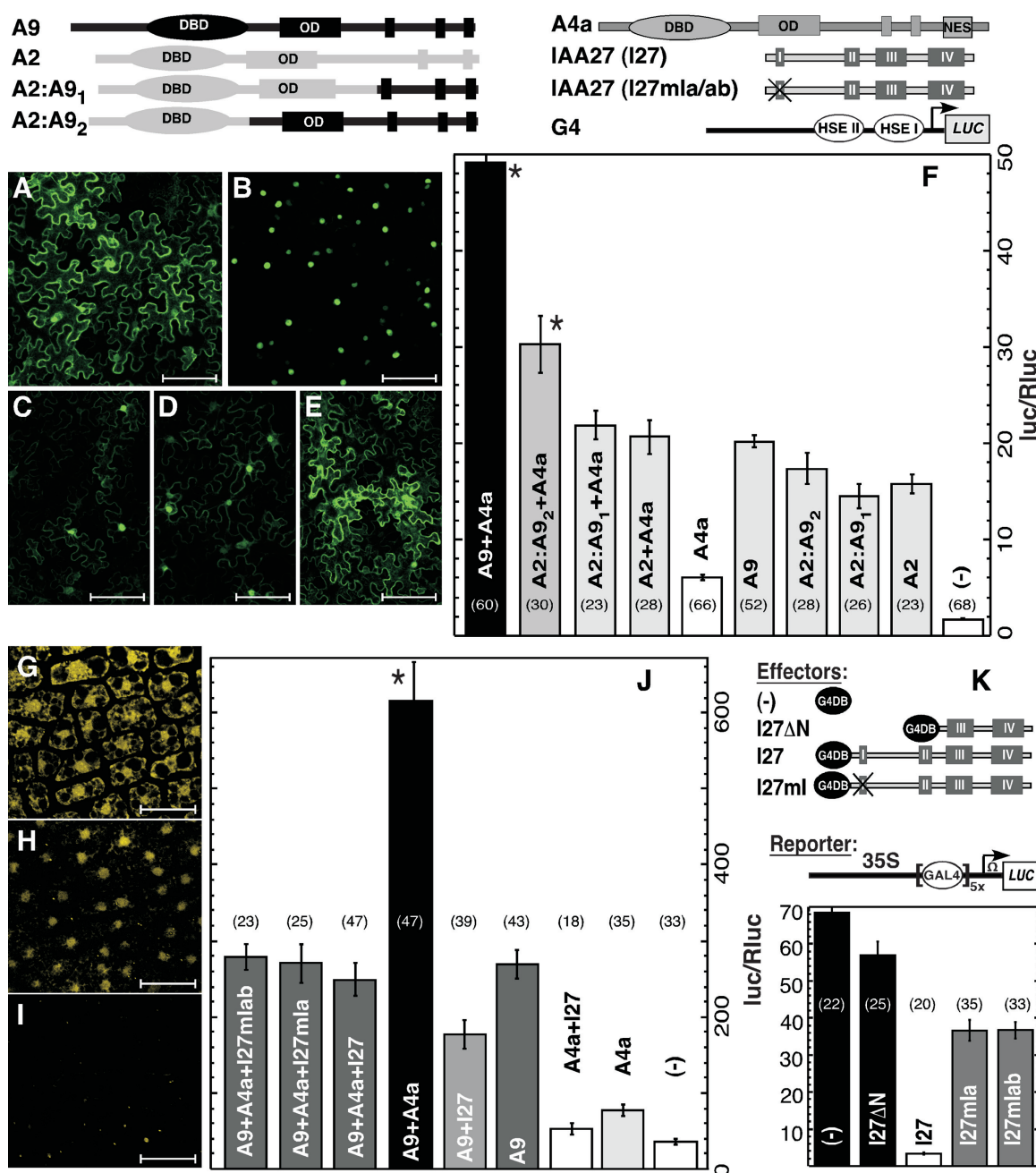
We investigated whether the nuclear localized HaHSFA9 (Supplemental Figures 4 and 5) could impair the nuclear export of HaHSFA4a. A HaHSFA4a:GFP fusion was localized mostly in the cytosol in leaves of *Nicotiana benthamiana* (Figure 1A). In contrast, co-expression of HaHSFA4a:GFP with HaHSFA9 caused a substantial increase of the nuclear localization of the former at the expense of a drastic reduction of the GFP signal in the cytosol (Figure 1C). This effect was similar to but not as strong as the localization change of HaHSFA4a caused by mutation of a nuclear export sequence (NES motif) present in HaHSFA4a (compare Figure 1B and 1C). Therefore, the interaction between HaHSFA9 and HaHSFA4a causes nuclear retention of HaHSFA4a. We also found that the sequences of HaHSFA9 that include the OD are required both for the nuclear retention of HaHSFA4a and for the synergism between HaHSFA4a and HaHSFA9. LpHSFA2, HaHSFA9, and two A2:A9 hybrid HSFs (A2:A9<sub>1</sub> and A2:A9<sub>2</sub>) were tested. The nuclear retention and the synergistic effect were not observed with LpHSFA2 or with the A2:A9<sub>1</sub> hybrid HSF, which lack the OD of HaHSFA9. In contrast, HaHSFA9 and the A2:A9<sub>2</sub> hybrid HSF (containing the HaHSFA9 OD) could synergize with HaHSFA4a and caused nuclear retention of HaHSFA4a (Figure 1C–1F and Supplemental Table 1). Therefore, nuclear retention of HaHSFA4a by HaHSFA9 might contribute to their synergistic co-activation. This is similar to

© The Author 2013. Published by the Molecular Plant Shanghai Editorial Office in association with Oxford University Press on behalf of CSPB and IPPE, SIBS, CAS.

doi:10.1093/mp/sst117, Advance Access publication 17 August 2013

Received 28 June 2013; accepted 4 August 2013





**Figure 1.** Passive Repression by HaIAA27 of the Synergism between HaHSFA9 and HaHSFA4a.

(A, B) Mostly cytosolic localization of HaHSFA4a:GFP (A) and enhanced nuclear localization of the NES mutant protein HaHSFA4a(NESmut):GFP (B). (C–E) Co-expression of HaHSFA4a:GFP with HaHSFA9 (C), or with the hybrid HSF A2:A9<sub>2</sub> (D), but not with the hybrid HSF A2:A9<sub>1</sub> (E) enhanced nuclear localization of HaHSFA4a:GFP. Assays performed in leaves of *Nicotiana benthamiana*. Bars = 100 μm.

(F) A synergistic transcriptional activation with HaHSFA4a (A4a) was observed using HaHSFA9 (A4a+A9), or with A2:A9<sub>2</sub> (A4a+A2:A9<sub>2</sub>), but not with the rest of HSFs analyzed in bombarded sunflower leaves, individually or in combination: none (–), LpHSFA2 (A2), hybrid HSF A2:A9<sub>1</sub> (A2:A9<sub>1</sub>).

(G–I) BiFC interaction in bombarded sunflower embryos; HaIAA27:YFP<sup>N</sup> + HaHSFA4a:YFP<sup>C</sup> (G); HaHSFA4a:YFP<sup>N</sup> + HaHSFA9:YFP<sup>C</sup> (H); HaHSFA4a:YFP<sup>N</sup> + HaHSFA9:YFP<sup>C</sup> + HaIAA27mlab (I). Bars = 30 μm.

(J) The WT and mutant domain I (ml) HaIAA27 (I27) proteins fully abolished the synergism between HaHSFA4a (A4a) and HaHSFA9 (A9). Analyses performed in bombarded sunflower embryos with the indicated combination of transcription factors.

(K) Active repression assays: a, WT, HaIAA27:GAL4-DB fusion protein (I27), but not the rest of analyzed HaIAA27 fusion proteins (maps on top) efficiently repressed 35S-induced transcription.

Maps of the G4 reporter gene and of the different effectors used in (F) and (H) are shown at the top of the figure. Numbers in parentheses show the number of replicates for each reporter/effector combination. The same bar shading indicates similar reporter activity. Error bars denote the SE. Asterisks indicate statistically significant synergism.

what was demonstrated for the synergism of LpHSFA2 and LpHSFA1 in tomato (Chan-Schaminet et al., 2009).

The results in Figure 1G demonstrate BiFC interaction between the HaIAA27 protein and HaHSFA4a in bombarded immature embryos of sunflower. The interaction between HaIAA27 and HaHSFA4a occurred both in the cytosol and in the nucleus. The hetero-oligomerization of HSFs (Chan-Schaminet et al., 2009; Scharf et al., 2012) and the interaction of HaIAA27 with HaHSFA9 (Carranco et al., 2010) both involve the HSF OD. Thus, a possible effect of HaIAA27 would be that it impairs the interaction between HaHSFA9 and HaHSFA4a. Such a possibility was analyzed by testing in bombarded sunflower embryos the effect of a stabilized form of HaIAA27 (HaIAA27mlab, Carranco et al., 2010) on the BiFC interaction between HaHSFA9 and HaHSFA4a. Indeed, when the HaIAA27mlab form was co-bombarded with HaHSFA4a and HaHSFA9, the nuclear interaction between the two HSFs was substantially reduced (compare Figure 1H and 1I).

That HaIAA27 represses the synergistic co-activation by HaHSFA9 and HaHSFA4a was observed in immature sunflower embryos. A very strong synergistic effect between HaHSFA9 and HaHSFA4a was observed (Figure 1J; see also Supplemental Table 1). This synergistic co-activation was fully abolished by HaIAA27. Indeed, in the presence of HaIAA27, HaHSFA9 and HaHSFA4a activated the G4 promoter to the same levels as observed with only HaHSFA9 in absence of the repressor. Such a drastic effect contrasted with the much moderate reduction of the transcriptional activation by either HaHSFA9 or HaHSFA4a when the effect of HaIAA27 was analyzed separately (Figure 1J).

The results in Figure 1H–1J indicate that HaIAA27 might repress the synergism mainly by a passive mechanism. Active repression of Auxin Response Factors (ARFs) by Aux/IAA proteins strictly depend on conserved leucine residues within domain I that are involved in interaction with TPL co-repressors (Tiwari et al., 2004; Szemenyei et al., 2008). We analyzed whether domain I mutant forms of HaIAA27 where these leucines are substituted by alanine still repress the HaHSFA9/A4a synergism. In HaIAA27mla, the L19, L21, and L23 residues within domain I were substituted. In HaIAA27mlab, two additional leucine residues (L12 and L14) were substituted. Both the mla and mlab mutants repressed the synergism in a similar way to the WT HaIAA27 protein (Figure 1J). The similar repression of the synergism by the WT, mla, and mlab proteins contrasts with a clear reduction of repression of 35S-induced transcription observed with both mla and mlab when compared to the WT HaIAA27 (Figure 1K). The reduction of active repression by these mutant proteins would thus not affect repression of the HaHSFA9/A4a synergism. We conclude that the HaIAA27 WT protein, which is stabilized in the immature embryos employed in Figure 1G–1K (Carranco et al., 2010), does not require the conserved leucines of domain I for repressing the HaHSFA9/A4a synergism. Thus, the observed repression would mainly occur by means of a novel passive mechanism. This agrees with previously published results from our lab that remained so far unexplained. Thus, the overexpression of either HaIAA27

or HaIAA27ΔN, a stabilized form of HaIAA27 that lacks N-terminal sequences including domains I and II, caused similar effects in transgenic tobacco. In both cases, loss of function of the HaHSFA9 program was observed, leading to reduction of seed longevity (Carranco et al., 2010). However, HaIAA27ΔN does not appear to contain unmapped active repression domains; HaIAA27ΔN, as the mla and mlab proteins, did not efficiently repress 35S-induced transcription (Figure 1K). This is consistent with the expected localization of active repression domains in Aux/IAA proteins: usually within domain I, and in some cases between domains I and II (Tiwari et al., 2004; Li et al., 2011). Because auxin induces the destabilization of HaIAA27 (Carranco et al., 2010), we propose that auxin might relieve the HaIAA27-mediated repression of the synergism between HaHSFA9 and HaHSFA4a; this would lead to the transcriptional activation of the genetic program of seed longevity controlled by at least these two HSFs. The total number of involved HSFs in sunflower is still unknown and it might differ between different plants. It is tempting to speculate that some natural Aux/IAA proteins, which, as HaIAA27ΔN, are devoid of domains I and II, in plants as for example poplar and maize (Kalluri et al., 2007; Wang et al., 2010), may still be able to modulate auxin responses through passive repression mechanisms similar to what we reported here.

## SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at *Molecular Plant Online*.

## FUNDING

This work was supported by the European Regional Development Fund (FEDER) and the Spanish Secretary of Research, Development, and Innovation (Grants BIO2008-00634 and BIO2011-23440 to J.J.). Additional funds were obtained from the Andalusian Regional Government (Grant BIO148 to J.J.).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dieter Scharf and Lutz Nover for manuscript pre-evaluation and advice. We also thank Masaru Ohme-Takagi and Pierre Forbert for the reporter plasmid and GAL4DB parent plasmids used for the repression assays of Figure 1K. We are indebted to Francisco Javier Durán for his assistance with plant material. No conflict of interest declared.

Javier Tejedor-Cano<sup>2</sup>, Raúl Carranco<sup>2</sup>,  
José-María Personat, Pilar Prieto-Dapena,  
Concepción Almoguera, José Manuel Espinosa,  
and Juan Jordano<sup>1</sup>

Departamento de Biotecnología Vegetal, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Seville, Spain

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed. E-mail [juan.jordano@csic.es](mailto:juan.jordano@csic.es), tel. +34 954 624711 (ext. 145), fax +34 954 624002.

<sup>2</sup> Equally contributing authors.

## REFERENCES

- Carranco, R., Espinosa, J.M., Prieto-Dapena, P., Almoguera, C., and Jordano, J. (2010). Repression by an auxin/indole acetic acid protein connects auxin signaling with heat shock factor-mediated seed longevity. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* **107**, 21908–21913.
- Chan-Schaminet, K.Y., Baniwal, S.K., Bublak, D., Nover, L., and Scharf, K.D. (2009). Specific interaction between tomato HsfA1 and HsfA2 creates hetero-oligomeric superactivator complexes for synergistic activation of heat stress gene expression. *J. Biol. Chem.* **284**, 20848–20857.
- Kalluri, U.C., Difazio, S.P., Brunner, A.M., and Tuskan, G.A. (2007). Genome-wide analysis of Aux/IAA and ARF gene families in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biol.* **7**, 59.
- Li, H., Tiwari, S.B., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (2011). Identical amino acid substitutions in the repression domain of auxin/indole-3-acetic acid proteins have contrasting effects on auxin signaling. *Plant Physiol.* **155**, 1252–1263.
- Prieto-Dapena, P., Castaño, R., Almoguera, C., and Jordano, J. (2006). Improved resistance to controlled deterioration in transgenic seeds. *Plant Physiol.* **142**, 1102–1112.
- Scharf, K.D., Berberich, T., Ebersberger, I., and Nover, L. (2012). The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution. *Biochim. Biophys. Acta.* **1819**, 104–119.
- Szemenyei, H., Hannon, M., and Long, J.A. (2008). TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science.* **319**, 1384–1386.
- Tejedor-Cano, J., Prieto-Dapena, P., Almoguera, C., Carranco, R., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., and Jordano, J. (2010). Loss of function of the HSFA9 seed longevity program. *Plant Cell Environ.* **33**, 1408–1417.
- Tiwari, S.B., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (2004). Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell.* **16**, 533–543.
- Wang, Y., Deng, D., Bian, Y., Lv, Y., and Xie, Q. (2010). Genome-wide analysis of primary auxin-responsive Aux/IAA gene family in maize (*Zea mays* L.). *Mol. Biol. Rep.* **37**, 3991–4001.



RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Co-overexpression of two *Heat Shock Factors* results in enhanced seed longevity and in synergistic effects on seedling tolerance to severe dehydration and oxidative stress

José-María Personat, Javier Tejedor-Cano, Pilar Prieto-Dapena, Concepción Almoguera and Juan Jordano\*

## Abstract

**Background:** We have previously reported that the seed-specific overexpression of sunflower (*Helianthus annuus* L.) Heat Shock Factor A9 (*HaHSFA9*) enhanced seed longevity in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). In addition, the overexpression of *HaHSFA9* in vegetative organs conferred tolerance to drastic levels of dehydration and oxidative stress.

**Results:** Here we found that the combined overexpression of sunflower Heat Shock Factor A4a (*HaHSFA4a*) and *HaHSFA9* enhanced all the previously reported phenotypes described for the overexpression of *HaHSFA9* alone. The improved phenotypes occurred in coincidence with only subtle changes in the accumulation of small Heat Shock Proteins (sHSP) that are encoded by genes activated by *HaHSFA9*. The single overexpression of *HaHSFA4a* in vegetative organs (which lack endogenous HSF A9 proteins) did not induce sHSP accumulation under control growth conditions; neither it conferred thermotolerance. The overexpression of *HaHSFA4a* alone also failed to induce tolerance to severe abiotic stress. Thus, a synergistic functional effect of both factors was evident in seedlings.

**Conclusions:** Our study revealed that *HaHSFA4a* requires *HaHSFA9* for *in planta* function. Our results strongly support the involvement of *HaHSFA4a* and *HaHSFA9* in transcriptional co-activation of a genetic program of longevity and desiccation tolerance in sunflower seeds. These results would also have potential application for improving seed longevity and tolerance to severe stress in vegetative organs.

**Keywords:** Combined overexpression, Drastic oxidative stress, Enhanced seed longevity, Heat Shock Factors, Severe dehydration, Stress tolerance, Transgenic tobacco

## Background

In the plant zygotic embryo, during orthodox seed maturation, different gene expression programs activate mechanisms that prevent and repair severe desiccation damage, at the same time allowing prolonged survival of the dry mature seed (reviewed [1-4] and references therein). Only the resurrection plants display similar levels of (dehydration and other abiotic) stress tolerance well beyond germination [5,6]. Interestingly, similar gene

expression programs appear to be activated both in seeds and in vegetative organs of resurrection plants [7,8]. In sunflower, one of these genetic programs, which has been extensively studied in our lab, is under transcriptional control by Heat Shock Factors (HSFs); these HSFs include the seed-specific *HaHSFA9* [9,10]. *HaHSFA9* enhanced seed longevity in transgenic tobacco [11], when overexpressed from *DS10* sequences (a seed-specific promoter). We have also shown that the ectopic overexpression of *HaHSFA9* from *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S sequences in tobacco seedlings conferred dramatic resistance of green organs and of whole seedlings to severe dehydration [12]. The tolerated

\* Correspondence: [juan.jordano@csic.es](mailto:juan.jordano@csic.es)  
Departamento de Biotecnología Vegetal, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 41012 Seville, Spain

dehydration was quantified as water loss of up to 98% of total water content. In addition, whole 35S:A9 seedlings resisted drastic oxidative stress conditions, as treatments in the dark with 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h [13]. The photosynthetic apparatus of the 35S:A9 seedlings, as well as other cellular membranes, resisted such stress conditions [13]. In all these instances, *HaHSFA9* overexpression activated genes that encode sHSPs from different classes. This resulted in the accumulation of cytosolic (CI, CII) and plastidial (P) sHSP forms. Most of the *HaHSFA9*-induced sHSPs are expressed mainly (or exclusively) during zygotic embryogenesis in seeds.

Precedent work in our lab indicated the existence of additional HSFs necessary for the activation of the *HSFA9* program. Thus, stabilized forms of the auxin/indole acetic acid (Aux/IAA) protein *HaIAA27* [14] or dominant-negative forms of *HaHSFA9*, but not inactive forms of *HaHSFA9* [10], both caused reduction of seed longevity and loss of function of the *HaHSFA9* program in tobacco seeds. We inferred that *HaIAA27* would repress not only *HaHSFA9*, but also the additional HSFs that were first indicated by our results of loss of function using dominant-negative forms of *HaHSFA9* [10]. The actual number of these additional HSFs is still unknown, but recently published results from our lab strongly indicated that *HaHSFA4a* is one of such HSFs [15]. *HaHSFA4a* showed *in planta* nuclear interaction with *HaHSFA9*; a synergistic transcriptional activation was observed on sunflower seed sHSP promoters, as *Hahsp 17.6 G1*, when *HaHSFA4a* was assayed together with *HaHSFA9*; and, finally, the interaction of both *HaHSFA9* and *HaHSFA4a* with *HaIAA27* lead to passive repression of the synergism between *HaHSFA9* and *HaHSFA4a* [14,15]. Based in these results, we have proposed that *HaHSFA4a* and *HaHSFA9* might synergistically co-activate the same genetic program of seed longevity and desiccation tolerance in sunflower [15]. This program, referred to as the *HSFA9* program, was functionally redundant with rest of programs that determine desiccation tolerance in seeds, programs that are inactive in vegetative organs [10].

Plant HSFs belong to different multigenic families (reviewed [16]). HSFs from these families, classes A, B, and C, differ among them and from other animal HSFs in short conserved sequences (signature sequences), and in structural features as the length and organization of the oligomerization domain (OD) and flexible linker sequences of variable length (15 to 80 amino acid residues) that connect the OD with the DNA-binding domain. The OD of class A HSFs has a characteristic insertion of 21 amino acid residues that extend the OD. This extended OD allows homo- and hetero-multimerization between class A HSFs [16]. The A4 HSFs (*HSFA4*) are characterized -among other properties- by the presence

of conserved signature sequences (PVHSHS) located immediately after the DNA-binding domain (for example, [17]).

Overexpression of transcription factors has some advantages; thus, it is less affected by the functional redundancy that exists within multigenic families [18]. Furthermore, there are precedents where the co-overexpression of two transcription factors could reveal a synergistic enhancement of the phenotypes caused by one of the factors in separate (for example, [19,20]). Some plant *HSFs* have been characterized by overexpression. The reported *HSF* overexpression studies using transgenic plants mostly involve single, class A, *HSFs* from a brief list of species that, besides sunflower, it includes *Arabidopsis*, lily, rice, tomato and wheat (for example, [21-30]). We do not know of precedent studies that involve the conjoint overexpression of multiple *HSFs*.

Functional studies of plant *HSFA4* are very scarce. There is only some evidence for *HSFA4* functions related to moderate stress responses [31-33], as well as a single *HSFA4* overexpression study that we know of [26]. The later study has showed in transgenic rice plants that a *HSFA4* from rice (*OsHSFA4a*), or from wheat (*TaHSFA4a*), can confer Cd tolerance. Thus, the available studies for plant *HSFA4* function have indicated their functional specialization.

In this work, we analyze the function of *HaHSFA4a* in transgenic tobacco. Tobacco is a plant closely related to sunflower, and we have showed that in tobacco transcriptional regulation of the *HSFA9* program is conserved ([10,14], references therein). We overexpress *HaHSFA4a* alone, and in combination with *HaHSFA9*. We should emphasize that seeds or seedlings from the different non-transgenic (NT), single-transgenic, and double-transgenic lines, were subjected to the same, stress or seed deterioration conditions, in each case. We also point out that as in our previous studies [10-14,20], a molecular characterization of HSP accumulation was performed with seeds and seedlings grown under control (unstressed) conditions, the same for all lines compared. We thus tried further exploring the correlation of the observed stress protection with the HSPs that are present before the stress treatments. Seeds that combine the *DS10*-driven overexpression of *HaHSFA4a* and *HaHSFA9* resisted accelerated aging better than seeds that overexpress *HaHSFA9* only. The single, *DS10*-driven, overexpression of *HaHSFA4a* enhanced seed longevity. However, the *35S*-driven overexpression of *HaHSFA4a* alone did not induce any sort of abiotic stress tolerance in vegetative organs of seedlings. In contrast, the *35S*-driven overexpression of both *HaHSFA4a* and *HaHSFA9* caused further tolerance of seedlings to severe dehydration and to drastic oxidative stress

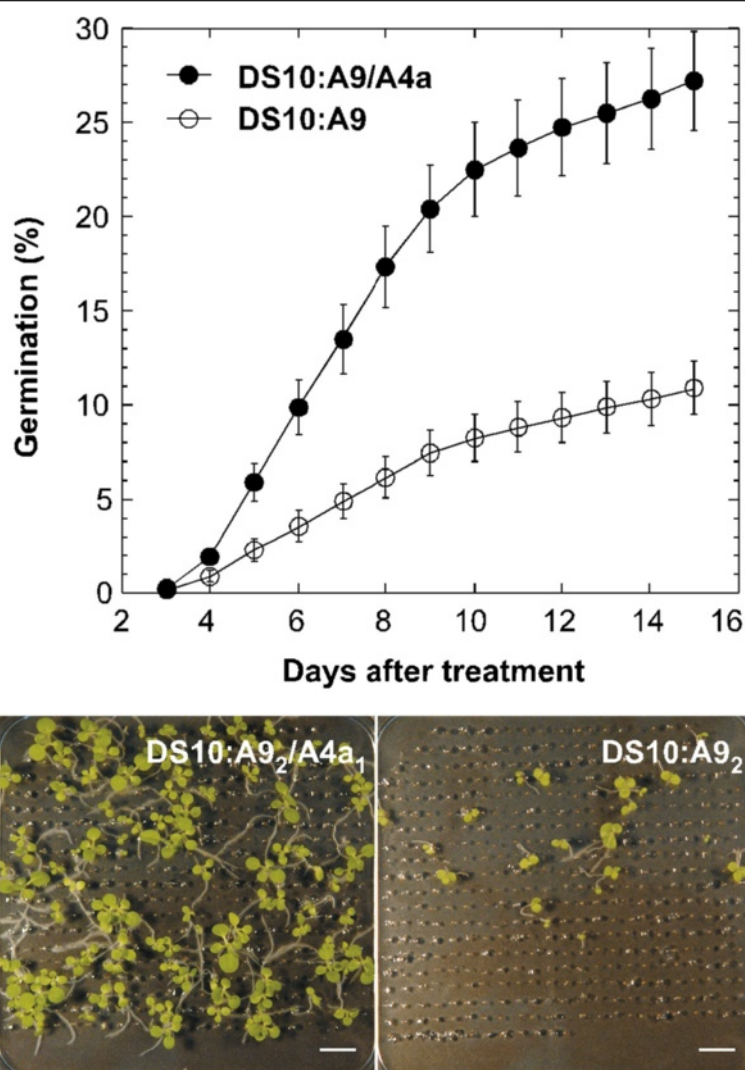
conditions, as compared to the effect of HaHSFA9 alone. The enhanced stress tolerance occurred in coincidence with only subtle changes in the accumulation of small Heat Shock Proteins (sHSP). These results demonstrate *in planta* functional effects of HaHSFA4a on seed longevity and on tolerance to severe abiotic stress conditions. These effects, which are unmatched for a plant HSFA4, required HaHSFA9 (and/or seed-specific tobacco HSFs).

## Results

### Enhanced seed longevity in plants that conjointly overexpress HaHSFA9 and HaHSFA4a

We have obtained lines that combine seed-specific overexpression of *HaHSFA9* and *HaHSFA4a*: the DS10:A9/

A4a lines. We analyzed seven different sibling pairs of DS10:A9 (single-homozygous) and DS10:A9/A4a (double-homozygous) lines. We investigated whether the overexpression of *HaHSFA4a* in the DS10:A9/A4a lines enhances resistance to accelerated aging, a measure of seed longevity. We performed accelerated aging procedures similar to that used in our earlier studies, except that the aging temperature was increased from 50°C to 52°C. This was required to substantially age the DS10:A9 seeds, as with the 50°C treatments only sibling non-transgenic seeds were substantially affected [11]. The results of the experiments summarized in Figure 1, clearly show a statistically significant increase of the resistance to accelerated aging of the DS10:A9/A4a lines compared to



**Figure 1** The combined overexpression of *HaHSFA9* and *HaHSFA4a* enhanced seed longevity beyond what achieved using only *HaHSFA9*. Percent of germination (mean values  $\pm$  SE) observed at different times after the aging treatments, at 52°C for 4 h, were compared between seeds of double homozygous DS10:A9/A4a and sibling, single homozygous DS10:A9 lines. The data correspond to three independent experiments performed with the seven pairs of sibling lines. Representative pictures of seedlings taken 15 days after the aging treatment are shown (bottom). Scale bars, 1 cm.

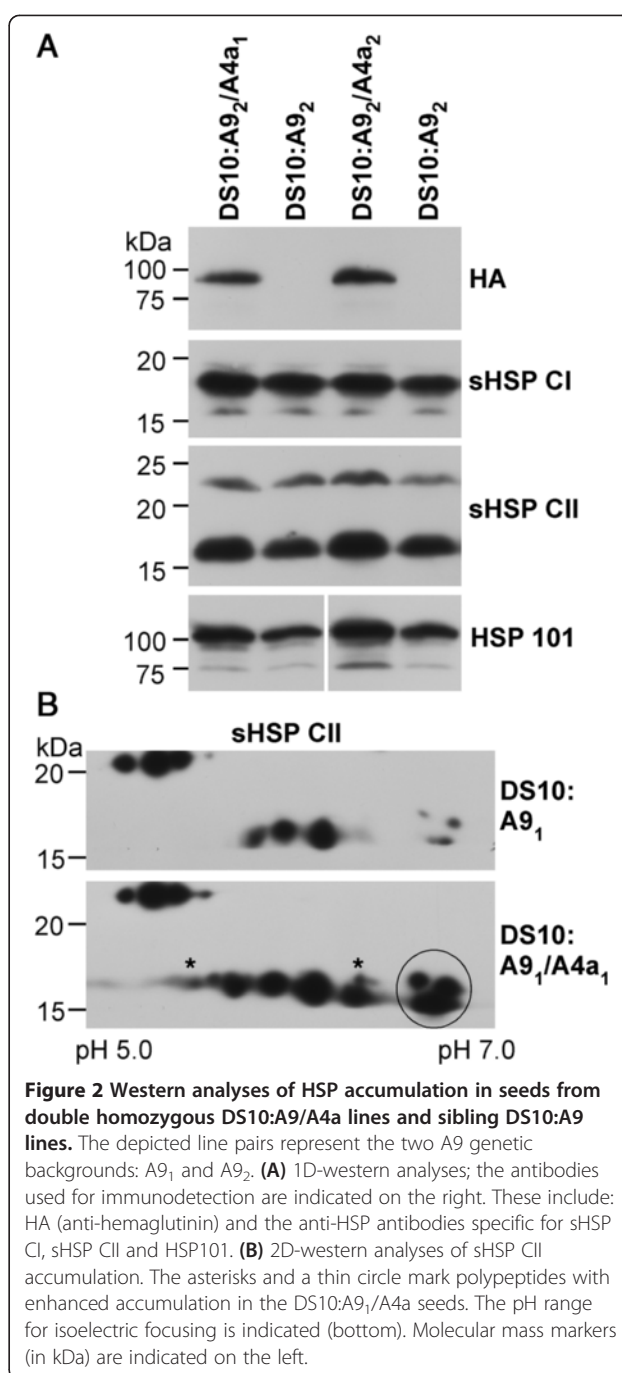
the sibling DS10:A9 lines ( $F = 32.95$ ,  $P < 0.0001$ , 1 and 831 df). We thus demonstrated in transgenic plants that the combined overexpression of *HaHsFA4a* and *HaHsFA9* enhanced seed-longevity beyond what observed for *HaHsFA9* in separate.

We also compared accelerated aging of single-homozygous DS10:A4a seeds with sibling NT seed. These aging treatments were also performed at 52°C, which allowed additional comparison with the experiments performed with the sibling DS10:A9 and DS10:A9/A4a lines (the results in Figure 1 explained above). The results of these experiments (Additional file 1) show that when only *HaHsFA4a* is overexpressed, this HSF enhances seed longevity. The comparison of data in Figure 1 with the results in Additional file 1 showed that seeds resisted the 52°C aging treatment in a similar way in the single-homozygous DS10:A4a lines as in the double-homozygous DS10:A9/A4a lines.

In the DS10:A4a seeds, *HaHsFA4a* overexpression enhanced HSP accumulation. 1D-western blots showed clear effects on HSP101 and sHSP CII accumulation, and lesser effects on the sHSP CI. 2D-western-blots confirmed this and the specific augmented accumulation of some sHSP forms (Additional file 2). In the DS10:A9/A4a seeds a specific enhancement of HSP accumulation, respect to the sibling DS10:A9 lines, also occurred. In 1D-western blots, this enhancement was detected only for HSP101. The enhancement of specific sHSP-CII accumulation was observed only in 2D-western blots (Figure 2). We would like to point out that, as explained with detail in the Methods section, we performed careful controls to insure equal loading of total protein in all the 1D and 2D-western analyses included in this report.

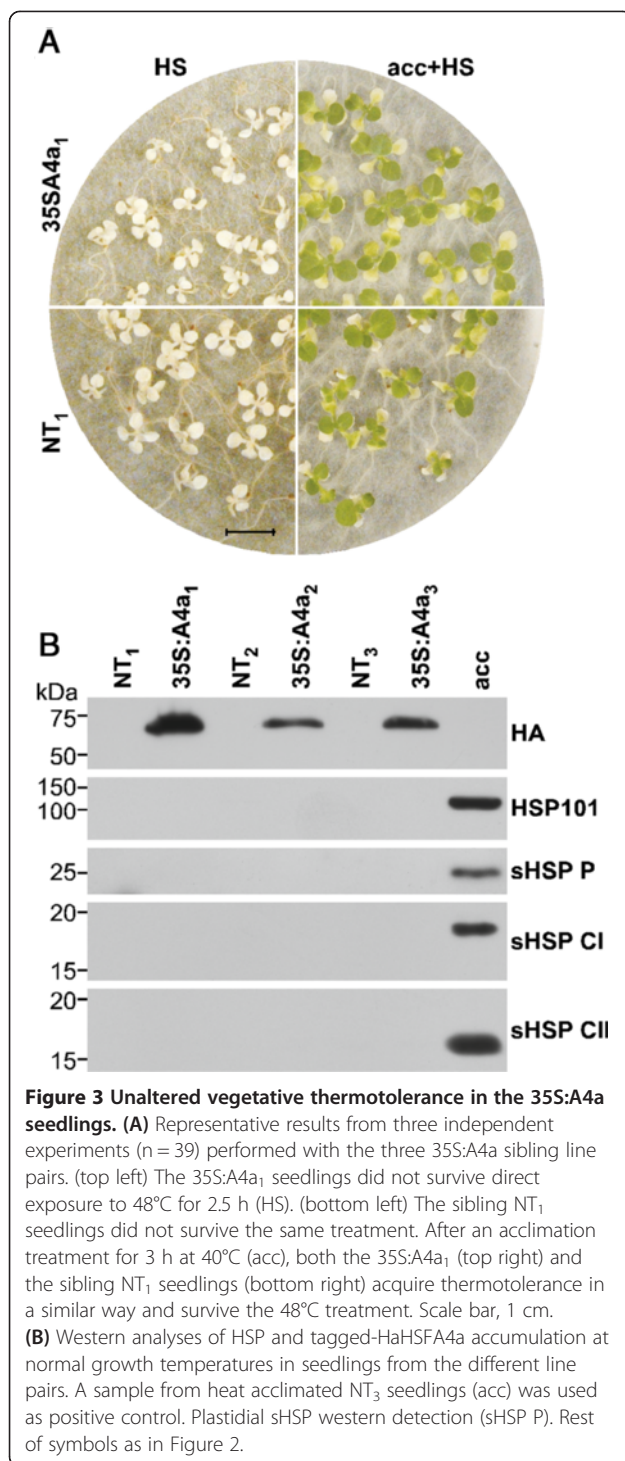
#### The single overexpression of *HaHsFA4a* does not induce stress tolerance in vegetative organs

We analyzed the effect of the single overexpression of *HaHsFA4a*, on seedling stress tolerance, using the 35S:A4a lines. In these studies, three different, homozygous transgenic/non-transgenic (NT) sibling line pairs were used: 35S:A4a<sub>1</sub>, NT<sub>1</sub>; 35S:A4a<sub>2</sub>, NT<sub>2</sub>; and 35S:A4a<sub>3</sub>, NT<sub>3</sub>. We first analyzed tolerance to severe dehydration and to drastic oxidative stress conditions. The single overexpression of *HaHsFA4a*, in the 35S:A4a seedlings, failed to induce tolerance to the severe dehydration and the drastic oxidative stress conditions that withstand the 35S:A9 seedlings ([12,13], Additional file 3: A, B); protection of the photosystem II (PSII) was not observed in the 35S:A4a seedlings (Additional file 3: C). We also determined if the overexpressed *HaHsFA4a* affects the basal-, or the acquired-thermotolerance of the 35S:A4a seedlings. We used experimental conditions as previously reported for similar studies of the effects of *HaHsFA9* [12]. Non-transgenic tobacco seedlings do not



withstand lethal heat stress treatments for 2.5 h at 48°C. The 35S:A4a seedlings also did not resist the same 48°C treatment (Figure 3A). This result contrasts with what found for the 35S:A9 seedlings, where basal thermotolerance was enhanced and survival after a similar 48°C treatment was observed [12]. The NT seedlings acquired thermotolerance, and resisted the 48°C treatment, only after a heat-acclimation treatment for three hours at the non-lethal temperature of 40°C (Figure 3A). The 35S:A4a seedlings also acquired thermotolerance and





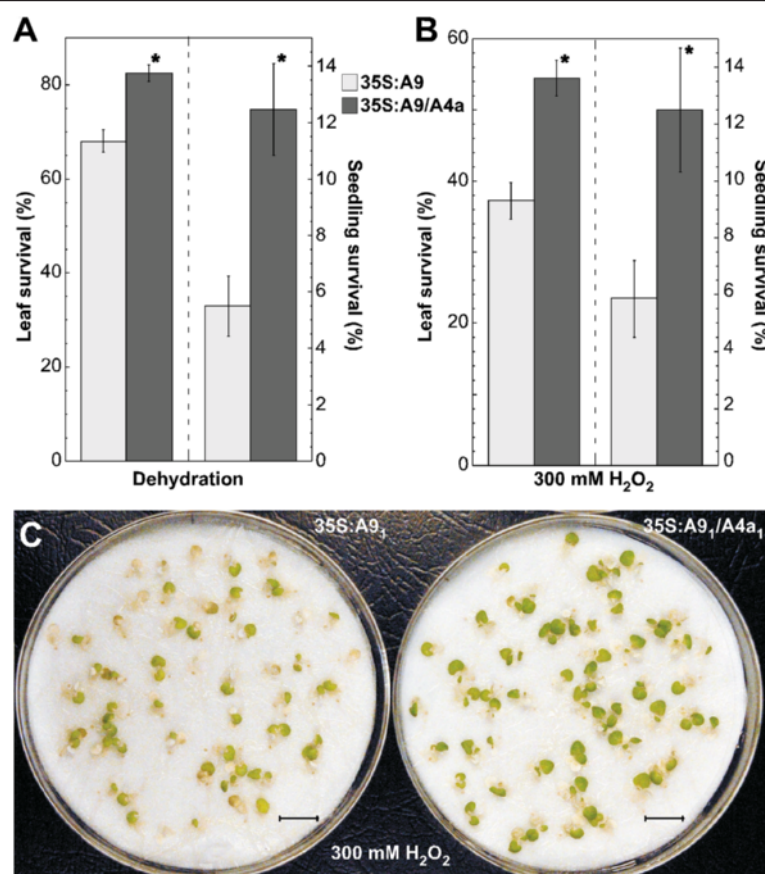
subsequently resisted the 48°C treatment in a similar way as the sibling NT seedlings (compare the representative results in Figure 3A). HSP accumulation, including that of HSP101 and of different sHSPs (P, CI and CII) was not detected at normal growth temperatures in the 35S:A4a seedlings; these proteins however were detected at normal levels in the heat acclimated transgenic and

sibling NT seedlings (Figure 3B; representative results shown for NT<sub>3</sub>).

#### Enhanced tolerance to severe dehydration and to drastic oxidative stress in plants that conjointly overexpress HaHSFA9 and HaHSFA4a

We determined whether the combined overexpression of *HaHSFA9* and *HaHSFA4a* in transgenic tobacco enhances the stress tolerance observed upon the single overexpression of *HaHSFA9* [12,13]. The previously reported stress tolerance was unusually high; however there was room for further improvement. For example, the aerial part of transgenic tobacco seedlings survived dehydration better than roots [12]. This limited survival of whole seedlings after a water loss of  $\approx 98\%$  of the total initial water content. The analyses summarized in Figure 4 where performed with four sibling pairs of single-homozygous (35S:A9) and double-homozygous (35S:A9/A4a) lines. The combined overexpression of *HaHSFA9* and *HaHSFA4a* in the 35S:A9/A4a lines substantially enhanced survival of whole seedlings after either stress treatment: severe dehydration (Figure 4A), or treatments with 300 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 4B). In both cases, survival of whole-35S:A9/A4a seedlings more than doubled that of 35S:A9 siblings. These differences were statistically highly significant (Figure 4A,  $t = -3.59$ ,  $P = 0.0004$ ; Figure 4B,  $t = -2.59$ ,  $P = 0.01$ ; see “seedling survival”). The surviving, whole-35S:A9/A4a seedlings represented slightly above 12% of the initial amount of seedlings. However, in most seedlings only some leaves resisted the stress treatments. Survival after dehydration of one to four leaves per seedling (Figure 4A) was also significantly higher for the 35S:A9/A4a lines compared to the 35S:A9 lines ( $t = -4.82$ ,  $P < 0.0001$ ). After the 300 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress treatments, only up to two true leaves per seedling survived, such survival (Figure 4B) was also higher for the 35S:A9/A4a lines compared to the 35S:A9 lines ( $t = -4.87$ ,  $P < 0.0001$ ). Figure 4C shows pictures with a representative example of the results summarized in Figure 4B.

Enhanced protection of the PSII, as evaluated with  $F_v/F_m$  values in the 35S:A9/A4a lines compared with sibling 35S:A9 lines, was also observed (Figure 5A), but only after the 300 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress treatments ( $F = 23.21$ ,  $P = 0.0001$ ). After, standard, 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments [13], there was not difference between the  $F_v/F_m$  of these lines ( $F = 0.236$ ,  $P = 0.63$ ). The additional protection of the PSII conferred by the combination of *HaHSFA9* and *HaHSFA4a* is thus observed only under very drastic, oxidative stress, conditions. The 35S:A9/A4a seedlings also showed lower electrolyte leakage under normal grown conditions, when compared to 35S:A9 siblings (Figure 5B). This supports the enhancement of protection of other cellular membranes (photosynthetic



**Figure 4** Enhanced resistance to drastic dehydration and oxidative stress conditions in the 35S:A9/A4a seedlings. Leaf-survival and whole seedling survival was evaluated. **(A)** Tolerance to severe dehydration. Data correspond to 17 independent experiments ( $n = 162$ ) performed with the four sibling 35S:A9/A4a and 35S:A9 line pairs. **(B)** Tolerance to drastic oxidative stress conditions (treatments with 300 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h). Data correspond to 10 independent experiments ( $n = 100$ ) performed with the same sibling line pairs. The dashed line in **(A)** and **(B)** separates the data that are described by the y-axis labels placed respectively to right or left in these panels. Data are mean values  $\pm$  SE. Asterisks denote statistically significant differences ( $P \leq 0.01$ ). **(C)** Representative results shown for survival of leaves and whole seedlings after the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments. Scale bars, 1 cm.

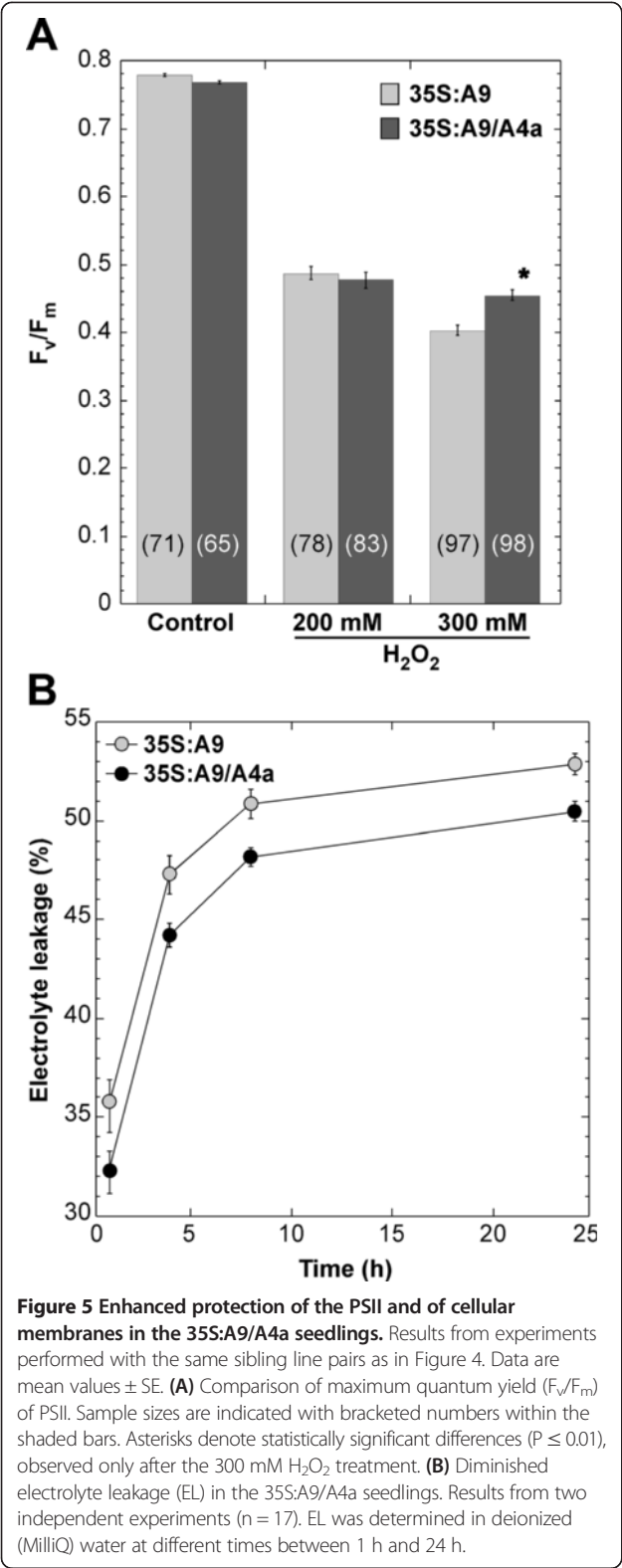
and non-photosynthetic) in the 35S:A9/A4a seedlings. We conclude that the overexpression of *HaHSFA4a*, in combination with that *HaHSFA9*, further enhanced the, already unusually high, stress resistance conferred by the single overexpression of *HaHSFA9*. Furthermore, the functional effects of *HaHSFA4a* in vegetative organs required *HaHSFA9*. We could show that the tagged *HaHSFA4a* protein was detected even at slightly higher level in the 35S:A4a than in the 35S:A9/A4a seedlings (Additional file 4). Thus, a functional interaction-specificity for HSFs as *HaHSFA9*, rather than the expression level of *HaHSFA4a* would explain the lack of effects of *HaHSFA4a* when singly overexpressed in seedlings.

The combined overexpression of *HaHSFA9* and *HaHSFA4a* in the 35S:A9/A4a seedlings, resulted only in a slight enhancement of specific HSP-accumulation at normal growth temperatures. This was observed upon very careful comparison with sibling 35S:A9 material. Among the analyzed HSPs (HSP101, sHSP-P, sHSP-CI

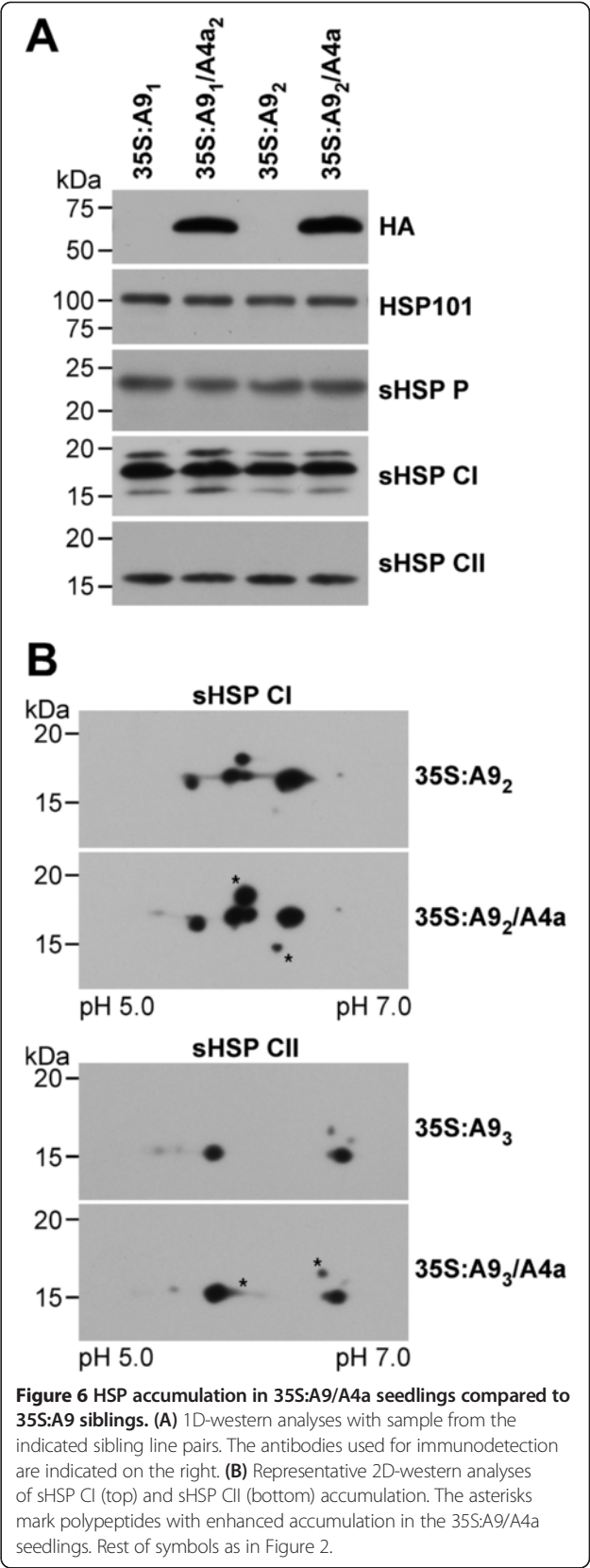
and sHSP-CII) only some cytosolic sHSPs (CI and CII) were affected; furthermore, this slight accumulation enhancement was detected using 2D gels, but not with 1D-gels (Figure 6). We think that it is unlikely that the observed enhancement of vegetative stress tolerance was caused by these sHSPs; these results would rather point to alternative or complementary effects of, still unknown, (i.e., non-HSP) genes coactivated by *HaHSFA9* and *HaHSFA4a*.

## Discussion

To date, synergistic interactions of plant HSFs that enhance transcriptional activation have been analyzed only by transient expression [15,34,35]. We note that, except for our precedent study [15], these interactions involve “vegetative HSFs” (constitutive or heat-induced). The interactions between “vegetative HSFs” would be thus relevant mostly for heat-, and other moderate stress responses in organs other than seeds. As far as we know,



our work represents the first report addressing the effects of combined overexpression of *HSFs* in transgenic plants. We could thus show that, in vegetative organs of



seedlings, HaHSFA9 and HaHSFA4a showed synergistic functional effects on tolerance to severe dehydration and to drastic oxidative stress (Figures 4 and 5). These results would functionally confirm that at least two HSFs, HaHSFA9 and HaHSFA4a, co-activate the same program of seed longevity and desiccation tolerance in sunflower.

There is a single report [26] that describes the effect of overexpression of *HSFA4* from wheat (*TaHSFA4a*) and rice (*OsHSFA4a*, *OsHSFA4d*). The overexpression of *TaHSFA4a* in rice plants conferred Cd tolerance. Unpublished observations cited in the same report suggest that *TaHSFA4a* is not involved in thermotolerance [26]. In addition, *TaHSFA4a* and *OsHSFA4a*, but not a similar monocot *HSFA4*, *OsHSFA4d*, conferred Cd tolerance in yeast [26]. Loss of function analyses of Arabidopsis *AtHSFA4c* and rice *OsHSFA4d* has indicated additional *HSFA4* functions. These functions include the sensing of moderate oxidative stress and gravitropism, thus being also unrelated to the conventional heat stress response and to thermotolerance [31-33]. The work reported here for *HaHSFA4a* includes the first described effects of overexpression of a dicot *HSFA4*. *HaHSFA4a*, as *TaHSFA4a* [26], does not seem to be involved in canonical heat responses or in thermotolerance. However, the functional effects of *HaHSFA4a* seem to be quite different from what was known for similar *HSFA4*. *HaHSFA4a* would be specifically involved in seed functions related to longevity and in tolerance to severe dehydration.

The observed functional effects of *HaHSFA4a* appear to require at least *HaHSFA9* and/or other seed-specific HSFs that are not present in vegetative organs, either in unstressed or heat-stressed conditions. This functional requirement would set apart *HaHSFA4a* from the rest of plant, class A, activator HSFs analyzed to date. The overexpression of *HaHSFA4a* in vegetative organs of seedlings potentiated phenotypes that we previously described for the overexpression of *HaHSFA9*, but only when *HaHSFA9* was conjointly overexpressed. *HaHSFA4a* overexpression also enhanced seed longevity, which is a *HaHSFA9* overexpression phenotype that we also have confirmed by loss of function [10]. These results agree with a hypermorphic effect of *HaHSFA4a* on *HaHSFA9*, which would safely support the suggested novel functions for *HaHSFA4a*. Because of the normal phenotype of the 35S:A4a plants, the potentiated phenotypes of the 35S:A9/A4a plants are explained as a synergistic enhancement of the effects of *HaHSFA9*. In tobacco seeds, where an endogenous *HSFA9* is expressed [10], the single overexpression of *HaHSFA4a* enhanced seed-longevity and HSP accumulation (Additional files 1 and 2). *HaHSFA4a* also augmented seed longevity when overexpressed together with *HaHSFA9* (Figure 1). However, this effect was similar to what observed in the single transgenic DS10:A4a lines (Additional file 1), and thus appears to be largely

dependent on endogenous HSFs (including *HSFA9*) and not of the overexpressed *HaHSFA9*. The levels of the endogenous *HSFA9* protein would be high and thus sufficient to account for the observed *HaHSFA4a* effect. Indeed, and consistently with this interpretation, the *HaHSFA9* protein appears to be quite abundant in sunflower seed embryos [9]. In contrast, in seedlings in absence of the endogenous *HSFA9* protein, the single overexpression of *HaHSFA4a* did not enhance thermotolerance; neither it induced accumulation, at normal growth temperatures, of HSPs as sHSP-CI, -CII, -P, and HSP101 (Figure 3). These results indicate that *HaHSFA4a* failed to functionally interact with the tobacco HSFs that are involved in vegetative thermotolerance; this would include the constitutive HSFs present in seedlings, and the HSFs induced by the heat-acclimation treatment used in Figure 3. This inference from the results in Figure 3 would agree with the specificity that *HaHSFA4a* showed in its synergistic interaction with *HaHSFA9*, but not with *LpHSFA2*, in transient assays [15]. The lack of effect of *HaHSFA4a*, on HSP accumulation and thermotolerance, contrasts with what observed upon the single overexpression of other class A HSFs; this includes, for example, *HSFA1b* (formerly named *HSF3*), *HSFA2*, *HSFA3*, and *HSFA9* of Arabidopsis and other plants [12,21-25,27,28,30]. In seedlings, the enhancement of dehydration and oxidative stress tolerance by *HaHSFA4a* was strictly dependent on the conjoint overexpression of *HaHSFA9* (compare Figure 3 and Additional file 3). Our results agree with reported transient expression analyses using *sHSP-CI* promoters in sunflower. These analyses showed that *HaHSFA4a* had very little (if any at all) transcriptional activity by itself [15]. In contrast, *HaHSFA4a* assayed together with *HaHSFA9* showed a strong synergistic transcriptional effect; furthermore, *HaHSFA4a* and *HaHSFA9* physically interact with each other [15]. Therefore, these two HSFs might cause in transgenic plants the observed functional effects as hetero-oligomers. Our results do not exclude the involvement in the same genetic program of additional HSFs besides *HSFA9* and *HSFA4a* in tobacco, sunflower and related plants. However, if additional HSFs able to functionally interact with *HaHSFA4a* exist in tobacco, these HSFs would be, as *HSFA9*, preferentially (or exclusively) expressed in seeds.

## Conclusions

Our work demonstrated a novel involvement of *HaHSFA4a* in seed longevity and severe stress tolerance, as well as the strict dependency on *HaHSFA9* (or similar tobacco HSF) of the functional effects of *HaHSFA4a*. These findings contribute to the very scarce previous knowledge on plant type A4 HSF (*HSFA4*) function. The single overexpression of *HaHSFA4a* did not alter vegetative stress



tolerance in transgenic tobacco. In contrast, HaHSFA4a enhanced seed longevity. Furthermore, in vegetative organs of seedlings HaHSFA9 and HaHSFA4a showed synergistic functional effects on tolerance to severe dehydration and to drastic oxidative stress. We thus showed potentially useful effects when HaHSFA4a and HaHSFA9 (or similar tobacco HSF) are combined. Our results might open new ways to engineering seed longevity and tolerance of plants to severe dehydration and to drastic oxidative stress conditions.

## Methods

### Generation of the, transgenic, DS10 lines

A 3xHA-tagged form of *HaHSFA4a* was integrated in a binary plasmid derived from pSK-ds10EC1 [36] and pBIB-Hyg [37]. This binary plasmid was named pBIB-DS10:3xHA:HaHSFA4a:DS10. The *HaHSFA4a* cDNA was amplified by PCR from pBI221:HaHSFA4a [15]. In this step, an *Xba*I site (located 3 bp before the ATG) and a *Sal*I site (located 5 bp after the STOP codon) were introduced with the oligonucleotides 5'-GTTGTTGGTATATCTAGATCAATGATGAATGATGTTTCATGG-3' and 5'-GTAAATTTAGACAGTCGACCATTATCAACTTCTCTCTACTG-3' (with an annealing temperature of 67°C). The amplified DNA (1215 bp) was digested with *Xba*I and *Sal*I. The resulting fragment (1178 bp) was introduced between the *Xba*I and *Sal*I sites of the pUC19-35S:HA vector [10], thus generating the pUC-35S:3xHA:HaHSFA4a plasmid. The 3xHA:HaHSFA4a cassette was amplified by PCR from this plasmid with the oligonucleotides 5'-TCTAGTAAAAATGGCATACC-3' and 5'-TTATCAACTTCTCTCTACTG-3'. The amplified 1339 bp fragment was introduced in the Klenow-filled *Eco*RI site of pSK-ds10EC1 [36], thus originating the pSK-ds10EC1:3xHA:HaHSFA4a plasmid. This plasmid was digested with *Sal*I and *Xba*I, and the resulting 4967 bp fragment was cloned between the corresponding sites of pBIB-Hyg [37], which originated, pBIB-DS10:3xHA:HaHSFA4a:DS10, the tagged DS10:A4a binary plasmid.

To obtain the, single-transgenic, DS10:A4a lines, we transformed tobacco with the tagged DS10:A4a binary plasmid. Using procedures that we have described in detail for DS10:A9 lines [11], except that selection of transgenic plants was on media with 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> hygromycin B, we obtained four different pairs of DS10:A4a lines (homozygous, single-transgenic) and sibling non-transgenic (NT) lines: DS10:A4a<sub>1</sub>, NT<sub>1</sub>; DS10:A4a<sub>2</sub>, NT<sub>2</sub>; DS10:A4a<sub>3</sub>, NT<sub>3</sub>; and DS10:A4a<sub>4</sub>, NT<sub>4</sub>.

To obtain the, double-transgenic, DS10:A9/A4a lines, two homozygous, DS10:A9, transgenic lines that overexpress *HaHSFA9* from *DS10* (a seed-specific promoter) were transformed with the tagged DS10:A4a binary plasmid. In this case, the parental, DS10:A9, transgenic lines were previously described as DS10:A9#6-7 and DS10:

A9#14-5 [11]. We first obtained heterozygous DS10:A4a lines (with single integration events) in the two homozygous DS10:A9 backgrounds. The double-homozygous DS10:A9/A4a lines were obtained by segregation on media with 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> hygromycin B in the subsequent generation. We also selected for the sibling DS10:A9 lines, which were used as the proper, single-transgenic control, lines. The selection procedures were described in detail for similar DS10 line pairs [20]. This resulted in the following seven, sibling, line pairs: DS10:A9<sub>1</sub>/A4a<sub>1</sub>, DS10:A9<sub>1</sub>; DS10:A9<sub>1</sub>/A4a<sub>2</sub>, DS10:A9<sub>1</sub>; DS10:A9<sub>2</sub>/A4a<sub>1</sub>, DS10:A9<sub>2</sub>; DS10:A9<sub>2</sub>/A4a<sub>2</sub>, DS10:A9<sub>2</sub>; DS10:A9<sub>2</sub>/A4a<sub>3</sub>, DS10:A9<sub>2</sub>; DS10:A9<sub>2</sub>/A4a<sub>4</sub>, DS10:A9<sub>2</sub>; and DS10:A9<sub>2</sub>/A4a<sub>5</sub>, DS10:A9<sub>2</sub>. The A9<sub>1</sub> and A9<sub>2</sub> backgrounds correspond to DS10:A9#6-7 and DS10:A9#14-5, respectively. In the A9<sub>1</sub> background, we obtained two, different, double-homozygous lines; five double-lines were obtained in the A9<sub>2</sub> background.

### Generation of the, transgenic, 35S lines

A 2284 pb, *Hind*III-*Kpn*I, DNA fragment excised from the pUC-35S-3xHA:HaHSFA4a plasmid (see above) was cloned between the *Hind*III and *Kpn*I sites of pBIB-Hyg [37]. As a result, we obtained pBIB-Hyg-35S-3xHA:HaHSFA4a, the tagged 35S:A4a binary plasmid. We transformed tobacco (var. Xanthi) with the tagged 35S:A4a binary plasmid. Using the procedures described for the selection of 35S:A9 line pairs [12], except that selection of transgenic plants was on media with 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> hygromycin B, we obtained three different pairs of 35S:A4a lines (homozygous, single-transgenic) and sibling NT lines: 35S:A4a<sub>1</sub>, NT<sub>1</sub>; 35S:A4a<sub>2</sub>, NT<sub>2</sub>, and 35S:A4a<sub>3</sub>, NT<sub>3</sub>.

Three homozygous transgenic lines that overexpress *HaHSFA9* from CaMV 35S sequences were transformed with the tagged 35S:A4a binary plasmid. The parental transgenic lines were previously described as 35S:A9#2-18, 35S:A9#12-4, and 35S:A9#17-8 [12]. We first obtained heterozygous 35S:A4a lines (with single integration events) in the three homozygous 35S:A9 backgrounds. The double-homozygous 35S:A9/A4a lines were obtained by segregation in the subsequent generation. We also selected for the, respective, sibling 35S:A9 lines, which were used as the proper, single-transgenic control, lines. We thus obtained four pairs of sibling lines: 35S:A9<sub>1</sub>/A4a<sub>1</sub>, 35S:A9<sub>1</sub>; 35S:A9<sub>1</sub>/A4a<sub>2</sub>, 35S:A9<sub>1</sub>; 35S:A9<sub>2</sub>/A4a, 35S:A9<sub>2</sub>, and 35S:A9<sub>3</sub>/A4a, 35S:A9<sub>3</sub>. The A9<sub>1</sub>, A9<sub>2</sub> and A9<sub>3</sub> backgrounds correspond to 35S:A9#2-18, 35S:A9#12-4, and 35S:A9#17-8 respectively. In the A9<sub>1</sub> background, we obtained two different double-homozygous lines, 35S:A9<sub>1</sub>/A4a<sub>1</sub> and 35S:A9<sub>1</sub>/A4a<sub>2</sub>.

### Seed longevity and seedling stress tolerance assays

Seed sterilization, germination, and seedling growth under controlled conditions were as described [11].

Germination of seeds after accelerated aging treatments was performed as previously reported [11], except that the treatments were for 4 h at 52°C.

Stress tolerance was analyzed in 3–4 week-old seedlings grown on Petri dishes with MS media. We performed severe dehydration (DT2) and oxidative stress treatments with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the dark for 24 h, using conditions essentially as described [12,13, respectively]. The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration was increased from 200 mM to 300 mM, to decrease survival of the 35S:A9 seedlings after the oxidative stress treatments. Thermotolerance (tolerance to high temperature) was analyzed using procedures that have been described for similar analyses of the 35S:A9 lines [12].

### Chlorophyll fluorescence

The maximal quantum efficiency ( $F_v/F_m$ ) of PSII was determined as the ratio of variable fluorescence ( $F_v$ ) to maximum fluorescence of dark-adapted state ( $F_m$ ). Chlorophyll fluorescence was measured with a mini-PAM Photosynthesis Yield Analyzer (Heinz Walz, Effeltrich, Germany); procedures were essentially as previously described [13].

### Electrolyte leakage

Electrolyte leakage (EL) was measured using an EC-Meter GLP 31+ conductivimeter (CRISON). Seedlings from the same Petri dish (50–60 seedlings) were placed in 25 mL of Milli-Q water and incubated with gentle shaking at room temperature for different times. Cumulative EL for each sample and time point was determined. Finally, the samples were autoclaved and the water brought back to room temperature to determine the total (100%) leakage values.

### Analyses of HSP accumulation

Western blots, after 1D- or 2D-electrophoresis, were performed using the procedures [11] and the HSP-specific antibodies that we previously described. We carefully adjusted the samples used in the 1D and 2D-western analyses for equal total protein amounts in the different comparisons. For 1D-westerns total protein content of samples was first estimated by Bradford assays and then verified by Ponceau S staining of the proteins transferred to the PVDF membranes. Examples of these loading controls are shown in Additional file 5. For 2D-westerns we used samples that were first quantified by Bradford and 1D gel assays, as for the 1D-westerns. The representative 2D-western results shown in Figures 2 and 5 and Additional file 2 were selected to show the protein spots that consistently increased in intensity respect other non-variable spots. We previously

demonstrated the specificity of the anti-sHSP CI and anti-sHSP CII antibodies generated in our lab. These antibodies showed class-sHSP specificity: the anti-sHSP CI antibodies do not recognize sHSP CII proteins and vice versa [38]. The commercial anti-HSP21 antibody (Agri-sera, AS08-285) detects only sHSP P proteins, but not sHSP CI and sHSP CII proteins [13]. The anti-HSP101 antibody (Agri-sera, AS07-253) is an anti-HSP101/ClpB N-terminal antibody that only detects heat-induced HSP101 proteins, but not the constitutive HSP101 proteins [20]. The anti-HA-peroxidase antibodies (high affinity 3F10) do not detect native plant proteins, under either control or stress conditions [20].

### Statistical analyses

In experiments were data showed normal distribution or could be normalized by logarithmic transformation (Figures 1 and 5, and Additional files 1 and 3), we used ANOVA. The ANOVA (Figure 5A and Additional file 3) and repeated-measures ANOVA analyses (Figures 1 and 5B, and Additional file 1) were as described with detail in a former publication from our lab [11]. Alternatively, t-Student tests were used when data could not be normalized (Figure 4), similarly to what we have previously reported (see [14], Table S1). F and t are the statistics respectively associated to the ANOVA and t-Student tests. In Figures 1, 4 and 5, we averaged the data for the different pairs of analogous sibling lines. In these cases, the statistical analysis of differences between the averaged data was consistent with the results obtained when the differences were separately analyzed for each sibling line pair.

### Additional files

**Additional file 1: The single overexpression of *HaHSA4a* in tobacco seeds enhanced seed longevity.** Percent of germination observed at different times after the aging treatments; comparison between seeds of homozygous DS10:A4a and sibling, non-transgenic (NT) lines.

**Additional file 2: Western analyses of HSP accumulation in seeds from different DS10:A4a line pairs.** (A) 1D-western analyses using the following antibodies: anti-hemagglutinin and the anti-HSP antibodies specific for sHSP CI, sHSP CII and HSP101. (B) 2D-western analyses of sHSP CI accumulation. (C) 2D-western analyses of sHSP CII accumulation.

**Additional file 3: The 35S:A4a seedlings did not resist drastic dehydration and oxidative stress conditions.** Percent of seedlings with one or more surviving leaf and whole seedling survival after the stress treatments. Data are mean values  $\pm$  SE. (A) Tolerance to severe dehydration. (B) Tolerance to drastic oxidative stress conditions. (C) Comparison of maximum quantum yield [ $F_v/F_m$ ] of PSII after treatments with H<sub>2</sub>O or with 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h.

**Additional file 4: Comparison of the accumulation levels of the tagged *HaHSA4a* protein in the 35S:A4a and 35S:A9/A4a seedlings.** 1D-western analyses using anti-hemagglutinin antibodies.

**Additional file 5: Examples of total protein loading controls for the protein samples analyzed by western blot in this article.** Ponceau S stained PVDF membranes.

## Abbreviations

Aux/IAA: Auxin/indole acetic acid protein; CaMV: Cauliflower mosaic virus; EL: Electrolyte leakage; HSFs: Heat Shock Factors; HaHSFA4a: (*Helianthus annuus* L.) Heat Shock Factor A4a; HaHSFA9: (*Helianthus annuus* L.) Heat Shock Factor A9; HSP: Heat Shock Protein(s); OD: Oligomerization domain; PSII: Photosystem II; sHSP: Small Heat Shock Protein(s).

## Competing interests

The authors declare have no competing interests.

## Authors' contributions

JMP performed most of the experimental work with the help of PPD and CA. JTC contributed with the initial transformation and characterization of the different transgenic lines. PPD performed the statistical analyses. JJ conceived and coordinated the study and wrote the manuscript. PPD and CA edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

This work was supported by the European Regional Development Fund (FEDER) and the Spanish Secretary of Research, Development, and Innovation (Grants BIO2008-00634 and BIO2011-23440 to JJ). Additional funds were obtained from the Andalusian Regional Government (Grant BIO148 to JJ). We acknowledge support of the publication fee by the CSIC Open Access Publication Support Initiative through its Unit of Information Resources for Research (URICI).

Received: 17 January 2014 Accepted: 26 February 2014

Published: 4 March 2014

## References

- Rajjou L, Debeaujon I: Seed longevity: survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *C R Biol* 2008, **331**(10):796–805.
- Chen H, Chu P, Zhou Y, Li Y, Liu J, Ding Y, Tsang EW, Jiang L, Wu K, Huang S: Overexpression of AtOGG1, a DNA glycosylase/AP lyase, enhances seed longevity and abiotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 2012, **63**(11):4107–4121.
- Chatelain E, Hundertmark M, Leprince O, Gall SL, Satour P, Deligny-Penninck S, Rogniaux H, Buitink J: Temporal profiling of the heat-stable proteome during late maturation of *Medicago truncatula* seeds identifies a restricted subset of late embryogenesis abundant proteins associated with longevity. *Plant Cell Environ* 2012, **35**(8):1440–1455.
- Chatelain E, Satour P, Laugier E, Ly Vu B, Payet N, Rey P, Montrichard F: Evidence for participation of the methionine sulfoxide reductase repair system in plant seed longevity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013, **110**(9):3633–3638.
- Cushman JC, Oliver MJ: Understanding vegetative desiccation tolerance using integrated functional genomics approaches within a comparative evolutionary framework. In *Plant Desiccation Tolerance*. Edited by Lüttge U, Beck E, Bartels D. Heidelberg Dordrecht London New York: Springer; 2011:307–338.
- Gechev TS, Dinakar C, Benina M, Toneva V, Bartels D: Molecular mechanisms of desiccation tolerance in resurrection plants. *Cell Mol Life Sci* 2012, **69**(19):3175–3186.
- Illing N, Denby KJ, Collett H, Shen A, Farrant JM: The signature of seeds in resurrection plants: A molecular and physiological comparison of desiccation tolerance in seeds and vegetative tissues. *Integr Comp Biol* 2005, **45**(5):771–787.
- Farrant JM, Moore JP: Programming desiccation-tolerance: from plants to seeds to resurrection plants. *Curr Opin Plant Biol* 2011, **14**(3):340–345.
- Almoguera C, Rojas A, Díaz-Martín J, Prieto-Dapena P, Carranco R, Jordano J: A seed-specific heat-shock transcription factor involved in developmental regulation during embryogenesis in sunflower. *J Biol Chem* 2002, **277**(46):43866–43872.
- Tejedor-Cano J, Prieto-Dapena P, Almoguera C, Carranco R, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Jordano J: Loss of function of the HSF9 seed longevity program. *Plant Cell Environ* 2010, **33**(8):1408–1417.
- Prieto-Dapena P, Castaño R, Almoguera C, Jordano J: Improved resistance to controlled deterioration in transgenic seeds. *Plant Physiol* 2006, **142**(3):1102–1112.
- Prieto-Dapena P, Castaño R, Almoguera C, Jordano J: The ectopic overexpression of a seed-specific transcription factor, HaHSFA9, confers tolerance to severe dehydration in vegetative organs. *Plant J* 2008, **54**(6):1004–1014.
- Almoguera C, Prieto-Dapena P, Personat JM, Tejedor-Cano J, Lindahl M, Diaz-Espejo A, Jordano J: Protection of the photosynthetic apparatus from extreme dehydration and oxidative stress in seedlings of transgenic tobacco. *PLoS ONE* 2012, **7**(12):e51443.
- Carranco R, Espinosa JM, Prieto-Dapena P, Almoguera C, Jordano J: Repression by an auxin/indole acetic acid protein connects auxin signaling with heat shock factor-mediated seed longevity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, **107**(50):21908–21913.
- Tejedor-Cano J, Carranco R, Personat JM, Prieto-Dapena P, Almoguera C, Espinosa JM, Jordano J: A passive repression mechanism that hinders synergic transcriptional activation by heat shock factors involved in sunflower seed longevity. *Mol Plant* 2014, **7**(1):256–259.
- Scharf KD, Berberich T, Ebersberger I, Nover L: The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution. *Biochim Biophys Acta* 2012, **1819**(2):104–119.
- Friedberg JN, Bowley SR, McKersie BD, Gurley WB, Czarnecka-Verner E: Isolation and characterization of class A4 heat shock transcription factor from alfalfa. *Plant Sci* 2006, **171**:332–344.
- Zhang JZ: Overexpression analysis of plant transcription factors. *Curr Opin Plant Biol* 2003, **6**(5):430–440.
- Hardtke CS, Kukurshumova W, Vidaurre DP, Singh SA, Stamatou G, Tiwari SB, Hagen G, Guilfoyle TJ, Berleth T: Overlapping and non-redundant functions of the *Arabidopsis* auxin response factors MONOPTEROS and NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 4. *Development* 2004, **131**(5):1089–1100.
- Almoguera C, Prieto-Dapena P, Díaz-Martín J, Espinosa JM, Carranco R, Jordano J: The HaDREB2 transcription factor enhances basal thermotolerance and longevity of seeds through functional interaction with HaHSFA9. *BMC Plant Biol* 2009, **9**:75.
- Prändl R, Hinderhofer K, Eggers SG, Schöffl F: HSF3, a new heat shock factor from *Arabidopsis thaliana*, derepresses the heat shock response and confers thermotolerance when overexpressed in transgenic plants. *Mol Genet* 1998, **258**(3):269–278.
- Mishra SK, Tripp J, Winkelhaus S, Tschiessner B, Theres K, Nover L, Scharf KD: In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes Dev* 2002, **16**(12):1555–1567.
- Nishizawa A, Yabuta Y, Yoshida E, Maruta T, Yoshimura K, Shigeoka S: *Arabidopsis* heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *Plant J* 2006, **48**(4):535–547.
- Ogawa D, Yamaguchi K, Nishiuchi T: High-level overexpression of the *Arabidopsis* HsfA2 gene confers not only increased thermotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth. *J Exp Bot* 2007, **58**(12):3373–3383.
- Yoshida T, Sakuma Y, Todaka D, Maruyama K, Qin F, Mizoi J, Kidokoro S, Fujita Y, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K: Functional analysis of an *Arabidopsis* heat-shock transcription factor HsfA3 in the transcriptional cascade downstream of the DREB2A stress-regulatory system. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, **368**(3):515–521.
- Shim D, Hwang JU, Lee J, Lee S, Choi Y, An G, Martinoia E, Lee Y: Orthologs of the class A4 heat shock transcription factor HsfA4a confer cadmium tolerance in wheat and rice. *Plant Cell* 2009, **21**:4031–4043.
- Banti V, Mafessoni F, Loreti E, Alpi A, Perata P: The heat-inducible transcription factor HsfA2 enhances anoxia tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2010, **152**(3):1471–1483.
- Xin H, Zhang H, Chen L, Li X, Lian Q, Yuan X, Hu X, Cao L, He X, Yi M: Cloning and characterization of HsfA2 from Lily (*Lilium longiflorum*). *Plant Cell Rep* 2010, **29**(8):875–885.
- Bechtold U, Albihl WS, Lawson T, Fryer MJ, Sparrow PAC, Richard F, Persad R, Bowden L, Hickman R, Martin C, Beynon JL, Buchanan-Wollaston V, Baker NR, Morison JIL, Schöffl F, Ott S, Mullineau PM: *Arabidopsis* HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR1b overexpression enhances water productivity, resistance to drought, and infection. *J Exp Bot* 2013, **64**(11):3467–3481.
- Li Z, Zhang L, Wang A, Xu X, Li J: Ectopic overexpression of *SlHsfA3*, a heat stress transcription factor from tomato, confers increased thermotolerance

and salt hypersensitivity in germination in transgenic *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 2013, **8**(1):e54880.

31. Yamanouchi U, Yano M, Lin H, Ashikari M, Yamada K: **A rice spotted leaf gene, *Spl7*, encodes a heat stress transcription factor protein.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**(11):7530–7535.
32. Davletova S, Rizhsky L, Liang H, Shengqiang Z, Oliver DJ, Coutu J, Shulaev V, Schlauch K, Mittler R: **Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*.** *Plant Cell* 2005, **17**(1):268–281.
33. Fortunati A, Piconese S, Tassone P, Ferrari S, Migliaccio F: **A new mutant of *Arabidopsis* disturbed in its roots, right-handed slanting, and gravitropism defines a gene that encodes a heat-shock factor.** *J Exp Bot* 2008, **59**(6):1363–1374.
34. Chan-Schammet KY, Baniwal SK, Bublak D, Nover L, Scharf KD: **Specific interaction between tomato HsfA1 and HsfA2 creates hetero-oligomeric superactivator complexes for synergistic activation of heat stress gene expression.** *J Biol Chem* 2009, **284**(31):20848–20857.
35. Li M, Berendzen KW, Schöffl F: **Promoter specificity and interactions between early and late *Arabidopsis* heat shock factors.** *Plant Mol Biol* 2010, **73**(4–5):559–567.
36. Rousselin P, Molinier J, Himber C, Schontz D, Prieto-Dapena P, Jordano J, Martini N, Weber S, Horn R, Ganssmann M, Grison R, Pagniez M, Toppan A, Friedt W, Hahne G: **Modification of sunflower oil quality by seed-specific expression of a heterologous  $\Delta 9$ -stearoyl-(acyl carrier protein) desaturase gene.** *Plant Breed* 2002, **121**:108–116.
37. Becker D: **Binary vectors which allow the exchange of plant selectable markers and reporter genes.** *Nucleic Acids Res* 1990, **18**(1):203.
38. Almoguera C, Coca MA, Jordano J: **Tissue-specific expression of sunflower heat shock proteins in response to water stress.** *Plant J* 1993, **4**(6):947–958.

doi:10.1186/1471-2229-14-56

**Cite this article as:** Personat et al.: Co-overexpression of two *Heat Shock Factors* results in enhanced seed longevity and in synergistic effects on seedling tolerance to severe dehydration and oxidative stress. *BMC Plant Biology* 2014 **14**:56.

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit



